

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年12 月31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/001053 A1(51) 国際特許分類: C12P 19/04,
C12N 1/16, A23D 9/00, A23L 1/30, 1/20, 1/10, A21D
2/08, A23G 3/00, A61K 31/716, A61P 3/06, 3/10, 43/00 //
(C12N 1/16, C12R 1:645, C08B 37:00)尾久 7 丁目 2 番 3 5 号 旭電化工業株式会社内 Tokyo
(JP). 杉山 宏 (SUGIYAMA, Hiromu) [JP/JP]; 〒116-0012
東京都 荒川区 東尾久 7 丁目 2 番 3 5 号 旭電化工業株
式会社内 Tokyo (JP). 東海林 義和 (SHOJI, Yoshikazu)
[JP/JP]; 〒116-0012 東京都 荒川区 東尾久 7 丁目 2 番
3 5 号 旭電化工業株式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007739

(22) 国際出願日: 2003 年6 月18 日 (18.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-185261 2002 年6 月25 日 (25.06.2002) JP
特願2002-206994 2002 年7 月16 日 (16.07.2002) JP(74) 代理人: 羽鳥 修 (HATORI, Osamu); 〒107-0052 東京都
港区 赤坂一丁目 8 番 6 号 赤坂 H K N ビル 6 階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭電
化工業株式会社 (ASAHI DENKA CO., LTD.) [JP/JP];
〒116-0012 東京都 荒川区 東尾久 7 丁目 2 番 3 5 号
Tokyo (JP).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 椿 和文 (TSUB-
AKI, Kazufumi) [JP/JP]; 〒116-0012 東京都 荒川区 東2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: β -GLUCAN-CONTAINING FAT COMPOSITIONS AND NOVEL MICROORGANISM PRODUCING β -GLUCAN(54) 発明の名称: β グルカン含有油脂組成物及び β グルカンを生産する新規微生物(57) Abstract: A β -glucan-containing composition which contains β -glucan originating in a microorganism or a basidiomycete. Using the β -glucan-containing composition, β -glucan can be uniformly dispersed in a food without worsening the texture, taste, etc. of the food. A novel microorganism capable of efficiently producing β -glucan, which has a high activity and favorable qualities and is usable as the microorganism-origin β -glucan as described above, at a high production speed from less expensive saccharides such as sucrose.(57) 要約: 本発明の β グルカン含有油脂組成物は、微生物類由来または担子菌類由来の β グルカンを含むものである。本発明の β グルカン含有油脂組成物によれば、 β グルカンを食品に均一に分散でき、かつ該食品の食味、食感等を低下させることがない。また、本発明の新規微生物は、上記の微生物類由来の β グルカンとして、シュークロース等の安価な糖類から、高活性で高品質の β グルカンを、効率良く高い生産速度で製造することができる。

明 細 書

 β グルカン含有油脂組成物及び β グルカンを生産する新規微生物

技術分野

本発明は、微生物類由来または担子菌類由来の β グルカンを含む油脂組成物に関するもので、本発明の油脂組成物は、 β グルカンが油脂中に均一に分散しており、食品等に使用することにより、生体調節機能を有する β グルカンを食品等に均一に分散でき、かつ該食品等の食味、食感、風味等を向上させる効果を有するものである。

また、本発明は、上記 β グルカンを得るのに有用な新規微生物及びその微生物を用いた β グルカンの製造方法に関する。

背景技術

β グルカンは、近年その優れた生体調節機能性、例えば、脂質代謝改善作用、整腸作用、血糖値上昇抑制等、あるいは、抗腫瘍効果や免疫増強作用が解析され、その利用が注目されている素材である。このような素材を加工食品にて広く利用することは、加工食品の機能性増強（高付加価値化）に寄与するのみならず、広く国民の健康維持への貢献が期待され、極めて有用なことである。 β グルカンは、多くの生物体、例えば、微生物類、担子菌類、植物に含まれており、主にこれら生物体の骨格をなすものであり、 β グルカンの大部分は細胞壁を構成する成分として存在している。その構造は、 β -1-2, 1-3, 1-4, 1-6-D-グルコピラノース結合の少なくとも2種類以上を有するグルコースの重合体を主成分とする。

特表2001-501996号公報では、穀類やイネ科植物由来の β グルカンについて検討されているが、穀類やイネ科植物由来の β グルカンは、ポリフェノールを含む場合があり、着色という問題が生じることがあった。さらに、含有量が少なく高価であるとの問題もあり、食品への応用は限界があった。

一方、微生物類や担子菌類の中には培養条件によって細胞壁成分と同様の上記

β グルカンを菌体外へ分泌する菌株が存在している。微生物類や担子菌類の細胞壁には多量の β グルカンが含まれている。

このような、微生物類や担子菌類の菌体外へ分泌された β グルカン、微生物類や担子菌類から分離、抽出、精製等の操作により採取された β グルカン、微生物類や担子菌類の細胞壁成分、さらには菌体自身等の、微生物類や担子菌類由来の β グルカンを、加工食品に添加する方法としては、例えば、1) 微生物類や担子菌類の培養菌体を加工食品原料へ直接添加する方法、2) 培養により得た微生物類や担子菌類の細胞壁成分を分離・精製し加工食品原料へ添加する方法、3) 菌体や分離された細胞壁成分から β グルカンを抽出し、抽出 β グルカンを加工食品原料へ添加する方法、4) 微生物類や担子菌類を培養した培養上清や培養上清から分離・精製した β グルカンを加工食品原料に添加する方法が考えられる。

しかし、上記の1)や2)の方法の場合、 β グルカンの多くは分子量1万以上の高分子量体であり、水に難溶性を示す β グルカンも存在し、加工食品素材に均一に混合させることが非常に困難であり、結果として、 β グルカンを添加した加工食品において食感の低下や焼けムラ等の製品価値の低下等の欠点が生じている。

これに対して、上記の3)や4)の方法の場合は、 β グルカンを比較的均一に加工食品に添加でき、 β グルカンの含有量を任意に調節できる利点があり有用である。しかし、抽出・精製した β グルカンは吸水性が大きく、例えば、小麦粉を主成分とする生地原料にそのまま添加し、水を加えて混捏すると、 β グルカンがダマになり、生地全体の中で不均一化を引き起こし、食味・食感の低下、品質の低下につながるという問題が発生する。また、予め水に溶解してから生地原料（主に粉体）に添加することで比較的均一に分散した β グルカン含有食品を得ることができるが、水に溶解させるのに時間がかかるのと同時に水溶液は粘性を呈し、均一な水溶液を得るのが容易ではなく、製造現場では作業性を損ない実際的ではないという欠点があった。

そこで、微生物類や担子菌類由来の β グルカンを含む加工食品を製造するにあたり、 β グルカンを均一に分散でき、且つ簡便に同加工食品を製造する方法あるいは、そのような β グルカン材料の開発が待たれていた。

一方、免疫系を活性化する β グルカン類としては、植物細胞壁成分（特公昭62-6692号公報、特開2001-323001号公報）、担子菌（キノコ）の子実体や菌糸体に含有されているもの（K. Sasaki et al., Carbohydrate Res., Vol. 47, 99-104(1976)、特開平05-345725号公報）、微生物菌体の細胞壁成分や菌体外に分泌生産される β グルカン等が知られている。

微生物菌体の細胞壁成分は、いずれにおいても β グルカンを含み免疫活性を増強する作用があることは一般的によく知られているが、特に安全性が高く食品としても利用価値が高いものとしては、酵母菌体（特開昭54-138115号公報、特開平09-103266号公報）、乳酸菌菌体（特開平03-229702号公報、特開平10-167972号公報）、アウレオバシジウム（*Aureobasidium*）菌体（特公平06-92441号公報）等が知られている。

また、免疫活性を増強する機能を有する β グルカンを菌体外に分泌生産する微生物としては、特開平03-2202号公報に記載の通り、マクロフォモプシス（*Macrophomopsis*）属、あるいは、アルカリゲネス属の生産するカードラン（食物繊維の科学、p108、朝倉書店、1997年）、アウレオバシジウム プルランス（*Aureobasidium pullulans*）（*Agaric. Biol. Chem.* 47(6), 1167-1172(1983)、特開平6-340701号公報）が知られている。

担子菌（キノコ）の子実体や菌糸体に含有されている β グルカンは、免疫増強活性が高く、シイタケ子実体より抽出されるレンチナンのように、医薬品として利用されているものもある。しかし、一般的に担子菌（キノコ）の子実体や菌糸体に含有されている β グルカンは、その生育・栽培条件により含まれる β グルカン量が大きく変動し、抽出操作で β グルカンを分離する必要があり、結果として得られる β グルカンが複雑多岐の分子種にわたり、高分子体と低分子体とが混在する等、品質が不安定なものとなっている。

このように担子菌（キノコ）では、高活性を有した一定の β グルカンを安定的に製造することが現時点での課題となっている。一方、微生物菌体の細胞壁は多量の β グルカンを含んでおり、 β グルカンの供給源として興味深い。しかし、微生物菌体の細胞壁自体は、 β グルカン以外の成分をも含み、また水に不溶性であるため、効果の高い水溶性の β グルカンを得るためには、担子菌と同様に抽出操

作が必要であることから、一定の品質の β グルカンを安定的に抽出する方法の確立が課題であるといえる。

これに対し、菌体外に免疫増強活性の高い水溶性 β グルカンを分泌生産する微生物を用いた β グルカンの発酵生産は、均一で水溶性の高活性な β グルカンを得ることが可能であり、きわめて有効な方法である。このような考えに基づき、高活性な β グルカンを菌体外に分泌生産することが知られているアウレオバシジウム属の微生物を用いた β グルカンの製造方法が提案されてきた。

しかしながら、アウレオバシジウム属の微生物は、シェーククロスのような一般的な微生物培養に用いる炭素源を用いて培養すると、 α グルカンであるプルランを菌体外に分泌生産することが知られており（特公昭51-36360号公報、特公昭51-42199号公報）、 β グルカンを純度よく製造することが困難であった（特開平06-340701号公報）。また、アウレオバシジウム属の微生物は、俗名で黒酵母と呼ばれ、菌体によって生産されるメラニン色素により菌体あるいは培養液が黒色に着色し、得られる β グルカンも着色することから、製造される β グルカンは品質が著しく損なわれたものとなっている。この点を改良するため、変異原処理により着色を認めない突然変異体を取得し、該突然変異体を用いたプルラン等の多糖体の製造方法が提案されている（特公平4-18835号公報）。しかし、メラニン色素を完全に生産せず、効率よく高純度の β グルカンを菌体外に分泌生産する（プルランを菌体外に分泌生産しない）菌株は、未だ知られていない。

また、 β グルカン製造過程、即ち培養工程において、不純物として挙げられるプルランの生産を抑制する培養方法が種々検討され、特開平06-340701号公報及び特開平07-51080号公報には、pH調整あるいは炭素源として特殊な糖類を用いることで、プルランの生産を押さえ、純度の高い β グルカンを生産できる方法が提案されている。この場合、特殊な培養条件を設定するため操作が煩雑であること、特殊な炭素源を利用するため培養に用いる培地のコストが高くなること等が、 β グルカンを製造する上で問題となっている。

以上のように、アウレオバシジウム属の微生物を用いて β グルカンを生産するためには、一般的に微生物培養に用いられる安価な糖類を炭素源として培養して

も、プルラン等の不純物の生産がないかあるいは抑制されており、且つ、 β グルカンの製造過程で実質的にメラニン色素の生産がないかあるいは抑制されており、生産された β グルカンが着色しないような、高活性で高品質の β グルカンを効率よく菌体外に分泌生産する菌株が必要とされている。

発明の開示

本発明の目的は、優れた生体調節機能性を有する β グルカンを食品に均一に分散でき、かつ該食品の食味、食感等を低下させることのない β グルカン材料を提供することにある。更に、シュクロース等の安価な糖類から高活性で高品質の β グルカンを効率良く高い生産速度で製造するのに有用な新規な微生物、該微生物を用いた β グルカンの製造方法、及び該微生物が菌体外に分泌生産する β グルカンを提供することにある。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、微生物類や担子菌類由来の β グルカンを使用し、これらを油脂または油脂組成物中に分散、混合させることにより、上記目的を達成する β グルカン材料が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。

また、本発明者らは、上記目的を達成するために、シュクロースから、純度の高い β グルカンを効率良く菌体外に分泌生産する能力を有する微生物の探索を行った。その結果、高品質の β グルカンを高効率で菌体外に分泌生産する新規な微生物を見出した。また、さらなる検討の結果、抗生物質シクロヘキシミドに耐性を有するアウレオバシジウム属に属する菌株が、純度の高い β グルカンを効率良く菌体外に分泌生産することを見出した。

即ち、本発明は、微生物類由来または担子菌類由来の β グルカンを含むことを特徴とする β グルカン含有油脂組成物を提供するものである。

また、本発明は、18S rRNA遺伝子の1732塩基の配列が、配列表の配列番号1に示す塩基配列、またはこの塩基配列と18S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、さらに抗生物質であるシクロヘキシミド(cycloheximide)に対する抵抗性を有し、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物を提供するものである。

また、本発明は、ITS-5.8S rRNA遺伝子の563塩基の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列、またはこの塩基配列とITS-5.8S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有し、好ましくはさらに抗生物質であるシクロヘキシミド (cycloheximide) に対する抵抗性を有する微生物を提供するものである。

また、本発明は、その構造に少なくとも β -1, 3-D-グルコピラノース結合を有する β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する上記微生物を提供するものである。

また、本発明は、アウレオバシジウム (Aureobasidium) 属に属する上記微生物を提供するものである。

また、本発明は、アウレオバシジウム プルランス (Aureobasidium pullulans) ADK-34 (FERM BP-8391) 菌株である上記微生物を提供するものである。

また、本発明は、上記微生物を培養（好ましくは炭素源として糖類を含有する培養液にて培養）し、 β グルカンを菌体外に分泌生産させることを特徴とする β グルカンの製造方法を提供するものである。

また、本発明は、ITS-5.8S rRNA遺伝子の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列と98%以上の相同性を示す微生物を培養（好ましくは炭素源として糖類を含有する培養液にて培養）し、 β グルカンを菌体外に分泌生産させることを特徴とする β グルカンの製造方法を提供するものである。

また、本発明は、アウレオバシジウム プルランス (Aureobasidium pullulans) ADK-34 (FERM BP-8391) 菌株を培養することによって菌体外に分泌生産され、その構造に少なくとも β -1, 3-D-グルコピラノース結合を有する β グルカン及び該 β グルカンを含む油脂組成物を提供するものである。

また、本発明は、上記の本発明の β グルカン含有油脂組成物を含有する食品や、上記の本発明の β グルカン含有油脂組成物を含有する生活習慣病予防作用を有する医薬品を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の油脂組成物に用いられる β グルカンは、微生物類または担子菌類から得られる、微生物類由来の β グルカンまたは担子菌類由来の β グルカンである。

まず、本発明で用いられる上記微生物類由来の β グルカンについて説明する。

微生物類は、細胞自身がその細胞壁に多量の β グルカンを含有しているので、上記微生物類由来の β グルカンとしては、微生物類をそれぞれの増殖培地に接種し菌体を増殖させることで得られる培養細胞をそのまま、また該培養細胞を破碎し内容物を除去して得られた培養細胞壁残査を用いることができる。また、上記培養細胞または上記培養細胞壁残査より抽出された β グルカンをそのまま、あるいは該抽出 β グルカンを精製したもののいずれも用いることができる。また、微生物類を培養することによって菌体外に分泌生産された β グルカンを利用することも可能であり、その場合は、培養終了後の培養液をそのまま、あるいは培養液から単離・精製された β グルカンを用いることができる。

これらのうち、微生物類をそれぞれの増殖培地に接種し菌体を増殖させることで得られる培養細胞をそのまま使用した場合、細胞内容物が、添加対象物の加工食品の食味・食感の低下あるいは物性の低下を引き起こす恐れがあるので、該培養細胞を破碎し内容物を除去して得られた培養細胞壁残査を用いるのが好ましく、さらに、上記培養細胞または上記培養細胞壁残査より抽出された β グルカンをそのまま、あるいは精製して用いるのがさらに好ましく、さらに、菌体外に分泌生産された β グルカンを培養液とともに、あるいは培養液から精製したものをを用いるのが最も好ましい。

上記 β グルカンを得るに適した微生物類は、従来より食用に供せられている微生物類が安全性が高く適している。即ち、酵母菌、乳酸菌、納豆菌、酢酸菌、麹菌、クロレラやスピルリナ等の藻類、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物等である。これらは、環境中（例えば食品、土壌、室内等）より分離された当該微生物を用いることができる。また、単菌分離された保存株あるいは分離株、さらにはそれらを常法に従い変異操作を実施した変異株を用いることができる。変異操作の例としては、例えばUV照射、あるいはニトロソグアニジ

ン、エチジウムブロマイド、メタンスルホン酸エチル、亜硝酸ナトリウム等による化学処理等が挙げられる。

上記酵母菌としては、ビール、発泡酒、焼酎、日本酒、ワイン、ウイスキー等のアルコール醸造や製パン工程で使用されるサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に分類される酵母類や、圧搾パン酵母、醤油醸造で使用する酵母類、微生物蛋白質生産に使用されるキャンディダ (*Candida*) 属の酵母菌等が挙げられる。

上記乳酸菌としては、桿菌のラクトバシラス (*Lactobacillus*) 属やビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属、球菌のロイコノストック (*Leuconostoc*) 属、ペディオコッカス (*Pediococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属の乳酸菌が通常使用されるが、その他、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、バゴコッカス (*Vagococcus*) 属、カルノバクテリウム (*Carnobacterium*) 属、アエロコッカス (*Aerococcus*) 属、テトラゲノコッカス (*Tetragenococcus*) 属の乳酸菌を利用することができる。具体的な乳酸菌株としては、ラクトバシルスブルガリス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバシルスヘルベティカス (*L. helveticus*)、ラクトバシルスアシドフィルス (*L. acidophilus*)、ラクトバシルスラクティス (*L. lactis*)、ラクトバシルスカゼイ (*L. casei*)、ラクトバシルスブレビス (*L. brevis*)、ラクトバシルスプラントラム (*L. plantarum*)、ラクトバシルスサケ (*L. sake*)、ストレプトコッカスサーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカスラクティス (*S. lactis*)、ストレプトコッカスクレモリス (*S. cremoris*)、ビフィドバクテリウムロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウムビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウムブレーベ (*B. breve*)、ビフィドバクテリウムインファンティス (*B. infantis*)、ロイコノストッククレモリス (*Leuconostoc cremoris*)、ロイコノストックメセンテロイデス (*Ln. mesenteroides*)、ロイコノストックオクノス (*Ln. ocnos*)、ペディオコッカスアシディラクティシ (*Pediococcus acidilactici*)、ペディオコッカスセレビスエ (*P. cerevisiae*)、ペディオコッカスペントサセウス (*P. pentosaceus*) 等の従来使用されている乳酸菌の1種類または2種類以上を使用できる。これらは単品で使用してもよく、2種類以上を共生させてもよい。また、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属の乳酸菌の培養とその他の乳酸菌

の培養とを別々に行い、これらを混合してもよい。

上記アウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物としては、当該微生物を培養することによって菌体外に β 結合を有するグルコース重合体を生産する菌株であるならばいずれでもよく、その例としてはアウレオバシジウムプルランス (*Aureobasidium pullulans*) の菌株であり、具体的には IF04464、IF04466、IF06353、IF07757、ATCC9348、ATCC3092、ATCC42023、ATCC433023等を用いることができる。その他、環境中（例えば食品、土壌、室内等）により分離された当該微生物を用いることができる。また、単菌分離された保存株あるいは分離株、さらにはそれらを常法に従い変異操作を実施した変異株を用いることができる。変異操作の例としては、例えばUV照射、あるいはニトロソグアニジン、エチジウムブロマイド、メタンスルホン酸エチル、亜硝酸ナトリウム等による化学処理等が挙げられる。

その他、納豆菌であるバシルス (*Bacillus*) 属の菌株、酢酸菌であるアセトバクター (*Acetobacter*) 属の菌株、麹菌類であるアスペルギルス (*Aspergillus*) 属やペニシリウム (*Penicillium*) 属の菌株、クロレラやスピルリナ等の藻類、乾燥クロレラ粉末、プルランを菌体外に分泌生産することが知られているアウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 属の菌株、その他食品添加物として使用される増粘多糖類を生産することが知られているキサントモナス (*Xanthomonas*) 属、アエロモナス (*Aeromonas*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属、エルウィナ (*Erwinia*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、スクレロティウム (*Sclerotium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、マクロホモプシス (*Macrophomopsis*) 属の菌株を用いることができる。

また、上記微生物類としては、本発明の新規微生物である、「18S rRNA遺伝子の1732塩基の配列が、配列表の配列番号1に示す塩基配列、またはこの塩基配列と18S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、さらに抗生物質であるシクロヘキシミド (cycloheximide) に対する抵抗性を有し、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物」、及び、「ITS-5.8S rRNA遺伝子の563塩基の配列が、配列

表の配列番号 2 に示す塩基配列、またはこの塩基配列と ITS-5.8S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、かつ、 β グルカン菌体外に分泌生産する能力を有する微生物」を好適に用いることができる。これらの本発明の新規微生物の詳細については後述する。

次に、本発明で用いられる上記担子菌類由来の β グルカンについて説明する。

担子菌類は、子実体や菌糸が塊状に集合した菌核に多量の β グルカンを含有しているので、子実体や菌核を微粉碎したもの、あるいは粉碎物から抽出された抽出物、あるいは抽出物から β グルカンを精製したもの等、いずれのものも担子菌類由来の β グルカンとして用いることができる。また、担子菌類の胞子を発芽させ、菌糸体をそれぞれの増殖培地に接種し菌体を増殖させることで得られる培養細胞をそのまま、また該培養細胞を破碎し内容物を除去して得られた培養細胞壁残査を用いることができる。また、上記培養細胞または上記培養細胞壁残査より抽出された β グルカンをそのまま、あるいは該抽出 β グルカンを精製したもののいずれも担子菌類由来の β グルカンとして用いることができる。また、担子菌類を培養することによって菌体外に分泌生産された β グルカンを利用することも可能であり、その場合は、培養終了後の培養液をそのまま、あるいは培養液から分離・精製された β グルカンを担子菌由来の β グルカンとして用いることができる。

これらのうち、子実体や菌核を微粉碎した β グルカンや、それらから抽出された β グルカン、胞子や菌糸体をそれぞれの増殖培地に接種し菌体を増殖させることで得られる培養細胞をそのまま使用した場合は、細胞内容物が、添加対象物の加工食品の食味・食感の低下あるいは物性の低下を引き起こす恐れがあるので、該培養細胞を破碎し内容物を除去して得られた培養細胞壁残査を用いるのが好ましく、さらに、上記培養細胞または上記培養細胞壁残査より抽出された β グルカンをそのまま、あるいは精製して用いるのがさらに好ましく、さらに、菌体外に分泌生産された β グルカンを培養液とともに、あるいは培養液から精製したものをを用いるのが最も好ましい。

担子菌類としては栽培品種が最も好ましいが、商業生産に供せられていない担子菌類からの β グルカンも本発明に利用することができる。例としては、アガリ

クス・ブラゼイ、アミガサタケ、アミタケ、エゾハリタケ、エノキタケ、カンゾウタケ、キクラゲ、キヌガサタケ、クリタケ、サケツバタケ、ササクレヒトヨタケ、サンゴハリタケ、シイタケ、ショウロ、シロキクラゲ、シロタモギタケ、スギヒラタケ、タモギタケ、チョレイマイタケ、ツバヒラタケ、冬中夏草、ナメコ、ナラタケ、ナラタケモドキ、ニオウシメジ、ニカワウロコタケ、ニカワハリタケ、ヌメリスギタケ、ヌメリスギタケモドキ、ハツタケ、ヒラタケ、ブクリョウ、フクロタケ、ブナシメジ、ブナハリタケ、ホンシメジ、マイタケ、マスタケ、マツオウジ、マッシュルーム、マツタケ、マンネンタケ、ムキタケ、ムラサキシメジ、ヤマドリタケ、ヤマブシタケ、ヤナギマツタケ等が挙げられる。

上記の微生物類や担子菌類の培養細胞壁残査を β グルカンとして単離する方法としては、培養した微生物類や培養した菌糸体あるいは栽培した菌核や子実体に適当量の溶媒を加え、自己消化あるいは加水分解酵素の添加により細胞壁の一部を破壊し内容物を流去させて、残査成分を回収することで培養細胞壁残査を β グルカンとして単離する方法が挙げられる。また、フレンチプレスや超音波破碎機等の物理的力により微生物類や担子菌類の細胞にダメージを与え一部を破壊し、内容物を除去し、残査を回収することで β グルカンとして得る方法もある。

β グルカンの抽出方法は、特に制限はなく、抽出原料となる微生物類または担子菌類に、抽出溶媒を添加し抽出すればよい。抽出溶媒は、水、塩溶液、酸水溶液、アルカリ水溶液、有機性溶媒等の一種または二種以上の混合溶媒等を用いることができる。また、細胞壁を分解する酵素を併用することで抽出効率を高めることができる。抽出物は、固液分離された場合の抽出液そのもの、あるいは抽出液より公知の方法で抽出された β グルカンを濃縮した液体や固体状のもの、あるいは抽出液より公知の方法で精製し純度を上げた液体や固体状のもの等、いずれの製造方法で得たものでも、いずれの形態のものでも、いずれの純度のものでも使用可能である。もちろん β グルカン以外の抽出された成分が混合していても何ら問題はない。本発明では、これらを全て微生物類または担子菌類から抽出された β グルカンという。

さらに、 β グルカンの微生物類または担子菌類からの抽出方法を説明すると、本発明で用いられる β グルカンは、水溶性高分子として水等の溶媒に溶解させる

ことができ、例えば担子菌である一般に市販されているキノコを乾燥させ、粉碎した粉末に、水、温水、熱水あるいは塩溶液、さらには酸、アルカリ性の水溶液、有機溶媒等を用いて、対粉2～100倍量の溶媒にて任意の時間、任意の温度で抽出することができる。さらに抽出液を固液分離して β グルカンを得ることができる。これらの中でも、水、温水または熱水で抽出された β グルカンが好ましく、温度80℃以下4℃以上の水で抽出された β グルカンがより好ましい。さらに抽出時に酵素溶液等の抽出促進剤等を加えてもよい。

本発明に用いられる β グルカンは、 β -1, 2-D-グルコピラノース結合、 β -1, 3-D-グルコピラノース結合、 β -1, 4-D-グルコピラノース結合、 β -1, 6-D-グルコピラノース結合を少なくとも2種類以上有する β グルカンが好ましく、特に β -1, 3-D-グルコピラノース結合および β -1, 4-D-グルコピラノース結合よりなる β グルカン、 β -1, 3-D-グルコピラノース結合および β -1, 6-D-グルコピラノース結合よりなる β グルカン、 β -1, 3-D-グルコピラノース結合、 β -1, 4-D-グルコピラノース結合および β -1, 6-D-グルコピラノース結合よりなる β グルカンを含むことが好ましい。ただし、 β -1, 3-D-グルコピラノース結合からなる、いわゆるカードランは、本発明では β グルカンに含めない。

また、本発明に用いられる β グルカンは、高分子体で、いずれの重量平均分子量を持つ β グルカンも使用可能であるが、分子量の低下と共に油脂との相和性がよくなるため、分子量300万以下、好ましくは50万以下、さらに好ましくは10万以下のものがよい。抽出された β グルカンは、油脂との相和性が良くなるように、公知の方法で低分子化してもよく、直接低分子量の β グルカンを抽出してもよい。

上記の微生物類由来、担子菌類由来または本発明の新規な微生物由来の β グルカンを混合、分散させる油脂または油脂組成物は、食用に供することができれば特に制限されない。例えば、米油、菜種油、大豆油、綿実油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、オリーブ油、魚油、牛脂、豚脂、カカオ脂、あるいはそれらを必要に応じ加工した硬化油、微水添油、異性化水添油、エステル交換油、分別油またはこれらの2種以上の加工を行なった油、並びにこれらの油脂の2種以上を混

合した油脂等のいずれも使用可能である。さらに、これらの食用油脂の乳化物（W/O乳化物あるいはO/W乳化物、さらにはO/W/O乳化物、W/O/Wの2重乳化物、またはそれ以上の高次乳化構造のエマルジョンを含む）や懸濁物等、油脂を分散媒または分散質とする分散系を使用することができる（以下、本明細書中では該分散系も油脂とする）。

本発明の β グルカン含有油脂組成物は、上記油脂に上記 β グルカンを添加後、混合させて得ることができる。

上記 β グルカンの上記油脂への添加方法は、 β グルカンの形態には特に制限はなく、 β グルカンをそのまま、あるいは β グルカンを水やその他の水溶性の溶媒に溶解させて、油脂に添加することができる。

上記油脂が乳化物の場合、既に乳化している油脂に β グルカンを添加させることも、乳化時に β グルカンを添加させることもできる。また、この際、 β グルカンを油相、水相のいずれに添加することも可能であるが、まず β グルカンを油相に添加、分散させた後、水相と混合するほうが、 β グルカンが油脂と良好に相和し、かつ均質な油脂組成物となり、 β グルカン含有油脂組成物が短時間で得られるので好ましい。

また、上記油脂が油中水型エマルジョンまたはこれを可塑化したもの等の場合は、上述のように油脂に β グルカンを添加してから乳化させることができる他、乳化時に β グルカンを添加することも、乳化後に β グルカンを添加することも、可塑化の後に β グルカンを添加することもできる。また、上記油脂が固体脂の場合は、必要に応じ適切な方法により軟化あるいは液状化させて β グルカンを混合することができる。さらに、高度に均一な状態で β グルカンを分散させるためには、粉体状の β グルカン100重量部に対して10～50重量部の油脂を添加し混合させた後、ロール掛けあるいはロール掛けに加えてコンチングを行なうことが望ましい。この際、他の原料の添加や追油等により、得ようとする β グルカン含有油脂組成物中の該 β グルカン成分含有量を調整することもできる。

上記油脂に上記 β グルカンを添加後の混合方法は特に限定されないが、 β グルカンを油脂と混合し50℃以上に一定時間、好ましくは5分以上6時間以下、さらに好ましくは10分以上2時間以下保持することにより、 β グルカンが均一に

分散し、かつ十分に油脂と相和した β グルカン含有油脂組成物を得ることができるので好ましく、この β グルカン含有油脂組成物を用いて製造された食品は、 β グルカンを直接添加する場合に比較して β グルカンが食品全体に均一に分散し、結果として、食味・食感を減じることなく、意外にも乳化剤の使用に起因した風味抑制を緩和する作用のあることや食品の風味発現の向上効果等の効果が著しい。

上記油脂と上記 β グルカンとの混合手段は特に限定されず、各種の混合・混練、攪拌機を用いることができる。例えば、プロペラ型攪拌機、往復回転型攪拌機、オリフィス混合機、かい型攪拌機、攪拌型乳化機（ホモミキサー）、カッターミキサー、コニーダー、コンチェ機、サイレントカッター、ジェットミキサー、真空攪拌機、スクリュウ型混合機、スタティックミキサー、カッティングミキサー、超音波乳化機、ニーダー、ロール、ハイドロロッシャー、パイプラインミキサー、ユニバーサルミキサー、ピン・マシン、ホモジナイザー（高圧均質機）、ボールカッター、リボンミキサー等を挙げることができる。好ましくは品温40℃以上80℃以下で攪拌型乳化機（ホモミキサー）および／またはホモジナイザー（高圧均質機）を使用するのが好ましい。

本発明の β グルカン含有油脂組成物は、上記 β グルカンと上記油脂とを上記方法で混合攪拌後、そのまま保存もしくは乳化物としても良く、さらには急冷可塑化させてもよい。この場合、ボテーター、コンビネーター、パーフェクター、コンプレクター、オンレーター等が使用できるが、品温10℃以下でピン・マシンを使用するのが好ましい。また、上記油脂を乳化し、ボテーター、コンビネーター、パーフェクター、コンプレクター、オンレーター等の急冷可塑化装置を使用した後、上記 β グルカンを添加し、上記いずれかの方法で β グルカン含有油脂組成物を調製してもよい。

上記 β グルカンの含有量は、本発明の組成物中、該 β グルカン以外の全組成物100重量部に対して、好ましくは0.01～500重量部、より好ましくは0.1～150重量部、特に好ましくは1～100重量部である。 β グルカンの含有量が0.01重量部未満であると、最終製品での該 β グルカンの機能性効果が得られないおそれがあり、500重量部を超えると、その他の成分の種類に拘わ

らず粉末状乃至ソボロ状となり、均一に β グルカンが混合、分散した食用油脂組成物とはならず、最終製品とした時にダマが残り β グルカンの分布が不均一になってしまう傾向が強い。

なお、微生物類または担子菌類からの抽出液を精製を行わずそのまま、あるいは該抽出液を粉体化、固体化処理のみを行なったものをそのまま使用する場合、該成分中の β グルカンの純度は、1～100%、好ましくは10～100%、さらに好ましくは20～100%であれば良く、高純度であればある程良い。

本発明の β グルカン含有油脂組成物には、該組成物中で β グルカンがダマや固まりになる等の不均一化をよりいっそう抑制するために、乳化剤、ゲル化剤、増粘剤、安定剤等の食品添加物を添加することも可能である。これらは食用であれば特に限定されず、乳化剤としては、例えば、レシチン、脂肪酸モノグリセライド、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、シュガーエステル等が挙げられ、増粘剤、安定剤としては、例えば、プルラン、サイリウム、アラビアガム、ジェランガム、グルコマンナン、グアーガム、キサントガム、タマリンドガム、カラギーナン、アルギン酸塩、ファーセルラン、ローカストビーンガム、ペクチン、カードラン及びそれらの低分子化物、澱粉、化工澱粉、各種 α 化デンプン、結晶セルロース、ゼラチン、デキストリン、寒天、デキストラン等が挙げられる。その他、ブドウ糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、酵素糖化水飴、乳糖、還元澱粉糖化物、異性化液糖、蔗糖結合水飴、オリゴ糖、還元糖ポリデキストロース、ソルビトール、還元乳糖、トレハロース、キシロース、キシリトール、マルチトール、エリスリトール、マンニトール、フラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、乳果オリゴ糖、ラフィノース、ラクチェロース、パラチノースオリゴ糖、ステビア、アスパルテム等の糖類、リン酸塩（ヘキサメタリン酸、第2リン酸、第1リン酸）、クエン酸のアルカリ金属塩（カリウム、ナトリウム等）等の安定剤、 α -ラクトアルブミンや β -ラクトグロブリン、血清アルブミン等のホエイ蛋白質、カゼイン、その他の乳蛋白質、低密度リポ蛋白質、高密度リポ蛋白質、ホスピチン、リベチン、リン糖蛋白質、オボアルブミン、コンアルブミン、オボムコイド等の卵蛋白質、グリアジン、グルテニン、プロラミン、グルテリン等の小麦蛋白質、その他動物性及び植物性蛋白質等の蛋

白質、食塩、岩塩、海塩、塩化カリウム等の無機塩類、酢酸、乳酸、グルコン酸等の酸味料、 β -カロチン、カラメル、紅麴色素等の着色料、トコフェロール、茶抽出物等の酸化防止剤、全卵、卵黄、卵白、酵素処理卵等の卵類、強力粉、中力粉、薄力粉等の穀類、大豆粉末等の豆類、水、着香料、乳製品、調味料、pH調整剤、酵素、食品保存料日持ち向上剤、果実、果汁、コーヒー、ナッツペースト、香辛料、カカオマス、ココアパウダーを含有させてもよい。これら上記に挙げた添加物の2種以上の併用も可能である。これらの添加物の添加量は特に限定されず、一般的な量であることができ、本発明の組成物中、例えば、0.01～15重量%である。

次に、本発明の食品について詳述する。本発明の食品は、上述した本発明の β グルカン含有油脂組成物を含有しているものであり、該油脂組成物をもって、食品中の従来の油脂の一部または全部を置換したものである。その態様としては、マーガリン、ショートニング等の油脂食品はもちろん、ベーカリー製品、製菓類、米加工品、小麦加工品、トウモロコシ加工品、大豆加工品、健康食品、薬用食品の他、油脂を含むあらゆる食品が挙げられる。また、本発明の食品は、例えば、サラダオイル、揚げ油、ホイップクリーム等の液状物、流動ショートニング等の流動状物、あるいは起泡性乳化脂やドレッシング、ファットスプレッド、カスタードクリーム、ディップクリーム等のペースト状物またはエマルジョン、あるいはショートニング、マーガリン、キャンディー、チョコレート、カレールー等の固体状物のいずれであっても、これらの食品中の油脂の一部または全部を本発明の β グルカン含有油脂組成物で置換して、従来と同様の使用態様で用いられるものである。

次に、本発明のベーカリー製品について詳述する。本発明のベーカリー製品は、上述した本発明の β グルカン含有油脂組成物を含有しており、該油脂組成物をもって、ベーカリー製品中の従来の油脂の一部または全部を置換して生地を調製し、該生地を焼成したものである。その態様としては、例えば、パン、パイ、カステラ、スポンジケーキ、バターケーキ、シュー菓子、ワッフル、醗酵菓子等が挙げられる。上記生地を調製する方法は特に限定されず、従来公知の方法で用いられている油脂の一部または全部を、本発明の β グルカン含有油脂組成物で置換

することにより行なうことができる。例えば、本発明のベーカリー製品がパンである場合、パン生地の調製においては、小麦粉、水、イースト、砂糖、食塩等の一般的製パン原料と、本発明の β グルカン含有食用油脂組成物とを公知の操作と同一の操作に付することによりパン生地を得ることができる。例えば混捏後、本発明の β グルカン含有油脂組成物をロールインし、一般的方法に従い、醗酵、成形、焙炉等を行い焼成することができる。同様に例えば、本発明のベーカリー製品が折パイであれば、ロールイン油脂または練込油脂の一部または全部を、練パイであれば、チップ状またはストロー状等の小片油脂の一部または全部を、スポンジケーキであれば、起泡性乳化脂またはケーキ用液状油の一部または全部を、本発明の β グルカン含有油脂組成物で置換して使用することができる。

ベーカリー製品が焼成工程を伴うものである場合、微生物類や担子菌類を β グルカンの供給源としてそのまま添加、使用したり、生地作成後に β グルカンをそのまま添加したり、粉体等に β グルカンをそのまま混合後生地作成を行うと、生地中でダマになりやすく、ダマや固まりになった場合は、食品にざらつき感やつぶつぶ感、水分の不均一さ、固さの違いに起因した違和感が発生する。一方、本発明の β グルカン含有油脂組成物を利用することによって、 β グルカンが均一に分散した、ダマや固まりの極めて少ない生地が得られ、焼成した最終製品は、異味を感じないばかりか、ソフトさが大幅に増した食感の良いベーカリー製品となる。

次に、本発明の製菓類について詳述する。本発明の製菓類は、上述した本発明の β グルカン含有油脂組成物を含有しており、該 β グルカン含有油脂組成物をもって、製菓類中の従来の油脂の一部または全部を置換して生地を調製し、該生地を加工したものである。その態様としては、例えば、生地をフライしたスナック、ドーナッツ類、蒸した蒸ケーキ、まんじゅう等の蒸菓子類が挙げられる。また、別の態様として、上述した本発明の β グルカン含有油脂組成物と、砂糖、香料等とを混合し、必要に応じて固化成形したキャンディー、ガム、チョコレート、打菓子等の他、ラクトアイス等の氷菓も挙げられる。

製菓類として、風味のみでなく、食味、特に甘味を大切にする製菓類を得たい場合には、ダマがないことがさらに重要であって、極僅かなダマでも、直ちに違

和感を生じてしまい、商品価値が低下する。本発明の β グルカン含有油脂組成物では、すでに β グルカンが均一に分散した形で存在しているため、製菓類に後添加、混合する場合でも、最終製品である本発明の製菓類は、含有する β グルカンが均一に分散し、ダマがなく、また異味の感じることのない良好な風味のものとなる。

本発明の β グルカン含有油脂組成物は、生活習慣病予防作用を有する食品成分を含んだ食品または医薬品に添加し、その作用を増強するために使用可能である。例えば、血中脂質濃度を適正化する高不飽和脂肪酸（EPA、DHA）、血清コレステロールを調節する植物ステロール、およびそのエステル化物、ジアシルグリセロール、 γ リノレン酸、 α リノレン酸、ビートファイバー、コーンファイバー、サイリウム種皮、茶ポリフェノール、レシチン、血圧降下に有効なカツオ節ペプチド、イワシペプチド、カゼインドデカペプチド、大豆分離蛋白質等、腸内環境を改善して整腸作用に働く乳酸菌、グルコン酸、オリゴ糖、各種食物繊維等を含む食品や医薬品である。その他、健康機能性を有することが知られている、クロレラ、スピルリナ、プロポリス、キチン、キトサン、核酸、霊芝、アガリクス、銀杏葉エキス、らかん果、ウコン、ガルシニア、アップルファイバー、ギムネマ、コラーゲン、ブルーベリー、アロエ、ノコギリヤシ、植物発酵酵素、大豆イソフラボン、葉緑素、ローヤルゼリー、高麗人参、プルーン、カモミール、タイム、セージ、ペパーミント、レモンバーム、マロウ、オレガノ、キャットニップティー、ヤロー、ハイビスカス等のハーブ類に、本発明の β グルカン含有油脂組成物を添加して生体調節機能性を増強した食品または医薬品を得ることができる。

また、本発明の β グルカン含有油脂組成物は、米加工品、小麦加工品、トウモロコシ加工品、大豆加工品に添加して、機能性を付与、増強することが可能である。例えば、米飯類（冷凍米飯・無菌米飯）；ビーフン、あられ、せんべい等の米加工品；上記に挙げたベーカリー製品、製菓類の他、パスタ、ソバ、うどん、ほうとう、中華麺等の麺類；その他小麦加工品；朝食シリアル、コーンフレークのようなトウモロコシ加工品；豆腐や豆乳、豆乳飲料、湯葉、油揚げ、厚揚げ、がんもどき、あん、みそ等の大豆加工食品が挙げられる。また、その他、牛乳、

加工乳、ヨーグルト、乳清飲料、乳酸菌飲料；バター、チーズ等の乳製品；ようかん、最中、餡のような和菓子類；ポタージュスープ、シチュー、カレー等のスープ類；醤油、ソース、たれ、ジャム、トマトケチャップ等の調味料類；ソーゼージのような畜肉加工品；かまぼこ、さつま揚げ等の水産練り製品を始めとするあらゆる食品に添加することができる。

β グルカンを得るのに適した微生物類として、前述の従来の微生物のなかではアウレオバシジウム属の微生物が挙げられるが、本発明は、 β グルカンの生産に優れた新規な微生物を提供するものである。以下にその微生物の詳細を述べる。

本発明の微生物は、18S rRNA遺伝子の1732塩基の配列が、配列表の配列番号1に示す塩基配列、またはこの塩基配列と18S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、さらにストレプトミセス グリセウス (*Streptomyces griseus*) 等によって生産される抗生物質であるシクロヘキシミド (cycloheximide) に対する抵抗性を有し、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物、及び、ITS-5.8S rRNA遺伝子の563塩基の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列、またはこの塩基配列とITS-5.8S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有し、好ましくはさらにストレプトミセス グリセウス (*Streptomyces griseus*) 等によって生産される抗生物質であるシクロヘキシミド (cycloheximide) に対する抵抗性を有する微生物である。

これらの本発明の微生物は、上記のような特徴を有する微生物であれば、野生株、保存株、寄託機関に寄託されている菌株、変異株〔UV照射や、例えば、N-メチル-N'-ニトロソグラニジン (NTG)、アクリジン、エタンメタンスルホネート (EMS)、亜硝酸等の化学物質による化学処理により突然変異を誘発させた変異株〕、あるいは、細胞融合もしくは遺伝子組み替え株等の生物工学的・遺伝子工学的的手法により誘導された改良菌株等、いかなる菌株であってもよい。

本発明の微生物は、環境、例えば、食品・野菜・果物・室内外の空气中（落下

菌)・床・壁・天井・屋根・モルタル・コンクリート・タイルの目地・シャワーカーテン・ビニルクロス・冷蔵庫・洗濯機・バスタブ・室内塵・植物体表面・土壌・河川・湖沼・海水等からも得ることができる。

本発明者等は、実施例に詳細を示すように、環境中から本発明の微生物を分離した。分離した本発明の微生物の中には、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物が認められた。中でも、純度が高く、非着色性の β グルカンを効率良く菌体外に分泌生産することができる1菌株をADK-34菌株と命名した。この菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566))に、微生物の表示(寄託者が付した識別のための表示)「*Aureobasidium pullulans* ADK-34」、受託番号「FERM BP-8391」として平成15年6月2日に寄託されている。

また、薬剤耐性については、その菌株のコンディション、培地の種類、培養期間によって耐性を示す濃度が異なる場合があることから、本発明において「シクロヘキシミドに対する抵抗性を有する」とは、IFO-4466株、IFO-6353株及びIFO-7757株を基準として、これらの菌株に比較して、シクロヘキシミドに対する抵抗性を有することをいう。即ち、シクロヘキシミドを含有する固形培地(寒天プレート)に菌株を接種し、26℃にて10日間培養したとき、これらのIFO菌株の生育が認められないようなシクロヘキシミド濃度を有する固形培地にて、直径0.1mm以上、好ましくは0.3mm以上、さらに好ましくは0.5mm以上の菌体増殖によるコロニー形成が観察される場合をいう。通常、これらのIFO菌株は、固形培地中のシクロヘキシミド濃度が20 μ g/ml以上であると生育が認められない。

また、本発明において、非着色性あるいは着色が抑制された、菌株あるいは培養液または β グルカンとは、培養液を適当に希釈し、菌体を遠心分離(10000 \times g、10min.)にて除去した培養希釈液の吸光度を490nmで測定し、同様に培養して得たIFO-6353株の培養希釈液の490nmにおける吸光度が0.1以上を示す条件において、本発明の微生物の菌株の場合、0.099以下、好ましくは0.060以下、さらに好ましくは0.050以下の場合を

いう。

また、本発明において、高純度とは、後記の分析例 3 に示す生成多糖のプルランに対する純度測定において、プルラナーゼ酵素処理を行った際、酵素処理後のフェノール硫酸値の酵素処理前のフェノール硫酸値に対する比が 75 % 以上、好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上であることをいう。

本発明の微生物は、 β グルカンを高純度の高効率に菌体外に生産させるのに有用である。本発明の微生物が生産する該 β グルカンは、その構造に少なくとも β -1, 3-D-グルコピラノース結合を有する β グルカンであることが好ましい。

本発明の微生物を用いた β グルカンの製造方法の好ましい実施形態について、以下に説明する。

本発明の微生物を用いた β グルカンの製造方法においては、本発明の微生物の菌株を該微生物が生育可能である培地に作用させ、菌体外の培地中に β グルカンを生産させればよい。また、本発明の微生物の菌株を培養して得られた培養菌体を分離し、該培養菌体を β グルカンの基質である糖類を含んだ溶液あるいは培地に作用させて、菌体外に β グルカンを生産させてもよい。ただし、菌体外への分泌が準備された分泌型の β グルカンを菌体内に内包している場合もあるので、このように菌体内に分泌のため準備蓄積されている β グルカンも、本発明においては菌体外に分泌される β グルカンとする。

本発明の微生物を用いた β グルカンの製造方法において、本発明の微生物の菌株を培養する培地としては、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物が通常利用できる栄養源 (炭素源、窒素源、無機塩類) を含有し、さらに必要に応じて有機栄養原を含む通常の培地を用いることができるが、炭素源として糖類を含有する培養液が好ましい。これらの培地としては、各種の合成培地、半合成培地、天然培地等いずれも利用可能である。

上記炭素源としては、糖類が好ましく、該糖類としては、グルコース、フラクトース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース等の単糖類、シュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース等の 2 糖類、フラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖等のオリゴ糖類、デキストリンやデンプン等の多糖類が

挙げられ、これらを単独又は組合せて用いることができる。これらの中でも、主炭素源として、グルコース、フラクトース等の6炭糖、シュクロース、ラクトース等の2糖類、デンプンやデキストリン、あるいはこれら炭水化物の加水分解物等の多糖類を用いるのが好ましい。また、ビート搾汁、サトウキビ搾汁、柑橘類をはじめとする果実搾汁、あるいはこれらの搾汁に糖を添加したもの等を用いることもできる。この他、グリセロール、エチレングリコール等のアルコール類、マンニトール、ソルビトール、エリスリット等の糖アルコール類、有機酸等のその他の炭素源を適宜使用することができる。これらの炭素源は、培養途中で随時添加してもよく、例えば、シュクロース等の糖類を培地中へ好ましくは3～500g/l、さらに好ましくは5～300g/l、最も好ましくは10～200g/lの濃度範囲となるように適宜フィードすると、 β グルカンの生産速度・生成量を相対的に増大させることができる。

上記窒素源としては、ペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、麦芽エキス、コーンスティープリカー、カゼイン分解物、酵母エキス、尿素等の有機窒素源、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、アンモニアガス、アンモニア水等の無機窒素源を単独又は組合せて用いることができる。

上記無機塩類としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化コバルト等の塩類、重金属類塩等を使用することができ、必要に応じてビタミン類も添加使用することができる。なお、培養中に発泡が生じる場合には、公知の各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできる。

本発明の微生物の菌株の培養条件には、格別の制限はなく、該菌株が良好に生育し得る範囲内で適宜選択することができる。通常、pH 5.0～8.5、20℃～35℃で2～8日間程度培養するとよいが、これらの培養条件は、使用微生物菌株の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更でき、最適条件を選択できる。また、培地への菌株の接種量は、フラスコ培養の場合は1白金耳、スケールアップの場合は種培養液を本培養液の1～10% (v/v) 添加することが好ましいが、実質的に培養可能であればこの限りではない。

本発明の微生物の菌株の培養は、通気攪拌、振とう等による好气的条件下で行

う。培養時間は、目的とする β グルカンの生成濃度に達するまで行われるのが好ましく、通常2～5日間で行われる。また、連続的に β グルカンの基質である糖類や培地成分を連続添加し、 β グルカンを連続的に生産してもよい。 β グルカンの基質であるシュークロース等の糖類は、粉末のままか、あるいは高濃度に水に溶解させた液糖として培養液に添加することができ、その添加量は、培養液1 l 当り0.1～500 gが好ましい。添加量を500 g/lより多くすると、生産速度が著しく遅くなり好ましくない。基質添加後は、好ましくは25～35℃で1～7日間、特に約2～5日間、振とうあるいは通気攪拌等の操作を行い、好気的条件下で反応を進行させることにより、基質であるシュークロース等の糖類から β グルカンを製造することができる。

また、本発明の微生物の菌株を培養することによって得られた培養菌体を分離して、該培養菌体あるいは該培養菌体の抽出液を触媒として β グルカンを製造することもできる。この場合は、培養菌体、培養菌体調製物又は培養菌体処理物の懸濁液に、基質である糖類溶液あるいは培地を添加すればよい。上記培養菌体調製物としては、該培養菌体を例えばホモジナイズした細胞破砕液等が挙げられ、また、上記培養菌体処理物としては、培養菌体あるいは細胞破砕液をアルギン酸ゲル中、イオン交換樹脂、セラミック、キトサン等に固定化した固定化菌体等が挙げられる。これらの培養菌体、培養菌体調製物又は培養菌体処理物の懸濁液の調製に使用できる溶液としては、前記した培地、あるいはトリスー酢酸、トリスー塩酸、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等の緩衝液を単独又は混合したものが挙げられる。該緩衝液のpHは、好ましくは3.5～9.0、さらに好ましくは5.0～8.0、最も好ましくは5.2～7.8である。前記懸濁液中の培養菌体の量は、特に限定されるものではないが、好ましくは湿容量比で0.1～10%程度がよい。

前記懸濁液への基質である糖類や培地の添加は、いかなる濃度、いかなる容量でも実施できるが、1回当りの基質の添加量は、菌体の活性を維持できる範囲が好ましい。例えば、懸濁液1 l 当り0.1～500 gを1回又は数回に分けて添加してもよいし、0.5～500 g/day程度で連続的に添加してもよい。菌体と基質とを作用させた溶液を、任意の時間と温度でインキュベーションするこ

とにより、 β グルカンを生産させることができるが、該インキュベーションは、前述した本発明の微生物の菌株の培養と同様の条件で実施することが好ましい。

前記の如く培養した後、菌体外に分泌生産された β グルカンは、常法に従って、培養液より分離、採取される。具体的には、培養液から遠心分離、濾過等により菌体等の固形物を分離除去したり、活性炭、イオン交換樹脂等により不純物や塩類を除去する等、種々の既知の精製手段を選択、組合せて行うことができる。さらに、例えば、疎水性樹脂への吸着・溶出、エタノール、メタノール、酢酸エチル、*n*-ブタノール等を用いた溶媒沈降、シリカゲル等によるカラム法あるいは薄層クロマトグラフィー、逆相カラムを用いた分取用高速液体クロマトグラフィー等を、単独あるいは適宜組合せ、場合により反復使用することにより、分離精製することができる。

また、菌体外に分泌生産された β グルカンを上記の方法で分離する前後において、菌体の殺菌を実施してもよい。殺菌温度は、菌体が死滅する温度であれば特に限定されるものではないが、好ましくは 50°C 以上、さらに好ましくは 60°C 、最も好ましくは 80°C 以上である。また、さらに温度を上げて、例えば、 90°C 以上、あるいは加圧下 121°C にて、菌体内に準備されている分泌型の β グルカンを熱水抽出することができる。殺菌時間及び熱水抽出時間は、任意の時間を設定できるが、好ましくは 10 分以上 8 時間以下、さらに好ましくは 15 分以上 6 時間以下、最も好ましくは 30 分以上 2 時間以下とすると、不純物の混入が抑えられ、 β グルカンが劣化しないので好適である。

また、本発明の微生物に代えて、ITS-5.8S rRNA遺伝子の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列と 98% 以上の相同性を示す微生物を用いて、上述と同様にして β グルカンを製造することもできる。

また、アウレオバシジウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) ADK-34 (FERM BP-8391) 菌株を用いて β グルカンを製造すると、その構造に少なくとも β -1, 3-D-グルコピラノース結合を有する β グルカンを得ることができるため好ましい。

本発明の微生物を用いた β グルカンの製造方法は、これまでに知られているアウレオバシジウム プルランスの菌株、あるいはアウレオバシジウム属に属する

微生物を用いた培養に比較すると、プルランの生産が著しく抑制されていることから、培養物からの β グルカンの分離が容易であり、また高純度の β グルカンを得るための精製操作が簡略化できるという利点がある。さらに、アウレオバシジウム属に属する微生物、酵母、乳酸菌等の菌体の細胞壁や担子菌類や植物からの抽出 β グルカンに比較して不純物が少なく、単離・精製操作が簡略化できると同時に、 β グルカンの着色が著しく抑制されていることから、高品質で一定の品質を保持した β グルカンを安定的に得ることが容易である。

本発明で得られる β グルカンは、着色がなく、高品質であり、そのまま、あるいは他の製品に添加することで、種々の用途に使用できる。

本発明で得られる β グルカンの用途としては、食品、食品添加剤、化粧品、トイレタリー製品、化成品、医薬品等が挙げられる。

食品の具体例を以下に挙げる。

油脂食品としては、マーガリン、ショートニング、マヨネーズ、クリーム、サラダオイル、揚げ油、ホイップクリーム、起泡性乳化脂、ドレッシング、ファットスプレッド、カスタードクリーム、ディップクリーム等が挙げられる。本発明で得られた β グルカンは、油脂との相溶性に優れており、前述したように、油脂に添加して、 β グルカンを含む油脂組成物（本発明の β グルカン含有油脂組成物）としてから、他の原料とともに用いることが好ましい。

さらに穀類関連製品としては、小麦粉を主成分とした食品、米類を主成分とした食品、米加工品、小麦加工品、トウモロコシ加工品、大豆加工品等が挙げられ、例えば、食パン、菓子パン、パイ・デニッシュ等のベーカリー製品、ホットケーキ、ドーナッツ、ピザ、天ぷら等、更にそれらのプレミックス、ビスケット、クッキー、スナック等の菓子類、生麺、乾麺、即席麺、カップ麺、うどん、蕎麦、中華麺、ビーフン、パスタ類等の麺類、炊飯米、餅、無菌米飯、レトルト炊飯米、上新粉、餅粉、団子、せんべい、あられ等の米製品が挙げられる。

さらに菓子類としては、チョコレート、キャンディー・ドロップ、飴、チューインガム、焼き菓子、ケーキ、饅頭等の洋菓子又は和菓子等が挙げられる。

さらに畜肉加工品としては、ハム・ソーセージ、ハンバーグ等が挙げられ、水産加工品としては、ちくわ、かまぼこ、さつま揚げ、魚肉ソーセージ等が挙げら

れる。

さらに乳製品としては、バター、チーズ、アイスクリーム、ヨーグルト等が挙げられる。

さらに飲料としては、ビール、酒、日本酒、ウイスキー、ブランデー、洋酒、焼酎、蒸留酒、発泡酒、ワイン、果実酒等のアルコール飲料、コーヒー、紅茶、日本茶、ウーロン茶、中国茶、ココア、炭酸飲料、栄養ドリンク、スポーツドリンク、コーヒードリンク、炭酸飲料、乳酸菌飲料、果汁・果実飲料等の飲料が挙げられる。

さらに調味料、ソース類としては、スパイス、タレ、焼肉のタレ、ドレッシング、ソース、味噌、醤油、カレー、ハヤシ等のルーが挙げられる。またスープとしては、コーンスープ、ポテトスープ、パンプキンスープ等のスープが挙げられる。その他、ジャム、ピーナッツバター、ふりかけ等が挙げられる。

さらに長期保存食品としては、水産物、畜肉、果実、野菜、キノコ、コーンビーフ、ジャム、トマト等の缶詰又は瓶詰め、冷凍食品等が挙げられ、また、カレー、シチュー、ミートソース、マーボ豆腐、食肉野菜混合煮、スープ、米飯等のレトルト食品が挙げられる。また、粉末食品としては、飲料、スープ、味噌汁等の粉末インスタント食品等が挙げられる。

さらに、健康食品、薬用食品、離乳食等の育児用食品、流動食等の病人食、老人食、ダイエット食、サプリメント等が挙げられる。

さらに、電子レンジ加熱食品、電子レンジ調理食品等が挙げられる。

食品添加剤としては、乳化剤、増粘剤、増粘安定剤、品質改良剤、酸化防止剤、安定剤、保存料、香料、甘味料、着色料、漂白剤、酸味料、ガムベース、調味料、苦味料、栄養強化剤、香辛料、製造用剤等が挙げられる。

化粧品、トイレットリー製品としては、皮膚化粧品、頭髮用化粧品、薬用化粧品、口腔用剤等が挙げられ、具体的には、化粧水、乳液、スキンミルク、クリーム、軟膏、ローション、カラミンローション、サンスクリーン剤、サンタン剤、アフターシェーブローション、プレシェーブローション、化粧下地料、パック料、クレンジング料、洗顔料、アクネ対策化粧料、エッセンス等の基礎化粧料；ファンデーション、白粉、アイシャドウ、アイライナー、アイブロー、チーク、口紅

、ネイルカラー等のメイクアップ化粧品；シャンプー、リンス、コンディショナー、ヘアカラー、ヘアトニック、セット剤、整髪料、育毛料、養毛剤、ボディパウダー、デオドラント、脱毛剤、石鹸、ボディシャンプー、ハンドソープ、香水、歯磨き、口腔ケア製品、入浴剤等が挙げられる。

化成品としては、界面活性剤、乳化剤、増粘剤、粘度調整剤等が挙げられる。

医薬品としては、コレステロール低下作用、整腸作用、血糖値上昇を抑制する作用などを有し、生活習慣病を予防する医薬品、免疫増強作用を有する医薬品等が挙げられる。

以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。なお、「部」及び「%」は特記しない限り重量基準である。

〔分析例1〕（ β グルカンの確認方法と含有量の測定方法）

多糖中の β グルカンの分析は、アルコールによって沈殿する全多糖量をフェノール硫酸法にて測定し、引き続き、沈殿させた多糖中の β グルカンの確認・定量を生化学工業（株）の β -1, 3-D-グルコピラノース結合を含む β グルカンの検出・測定用キットを用いて行った。以下にその手順を説明する。

まず、測定サンプル中の全多糖量をフェノール硫酸法にて測定した。すなわち、サンプル溶液30 μ lに蒸留水30 μ lを加え、ここに300mMのNaClを含むリン酸緩衝液（pH6.9）を120 μ l加え、さらにエタノール540 μ l（3倍量）を添加し、-15℃に10分間放置して多糖を沈殿させた。上清を除去後、100 μ lの蒸留水を添加して沈殿を溶解させた。ここに5重量%フェノール水溶液100 μ l及び硫酸500 μ lを加えて反応させ後、該溶液の490nmにおける吸光度を測定した。また、サンプルを加えず蒸留水100 μ lに5重量%フェノール水溶液100 μ l及び硫酸500 μ lを加えたものをブランクとして、該ブランクの490nmにおける吸光度を測定した。プルランの10mg/mlから2倍希釈系列を作成したものを標準サンプルとし、該標準サンプルを使用して検量線を作成し、該検量線と上記吸光度から、サンプル中の全多糖量の定量を実施した。

次に、全多糖量が $0.1 \sim 1 \text{ mg/ml}$ 前後の溶液を、まず、 1.0 M の NaOH にて 10 倍希釈し、引き続き β グルカンフリーの蒸留水にて希釈し、 10^{10} 倍まで希釈し、 β グルカン希釈液を調製した。 β グルカン希釈液 $50 \mu\text{l}$ をチューブにとり、主反応試薬 $50 \mu\text{l}$ を添加して、 37°C にて 30 分間インキュベートした。続いて、亜硝酸ナトリウム溶液 $50 \mu\text{l}$ 、スルファミン酸アンモニウム $50 \mu\text{l}$ 、 N メチル 2 ピロリドン溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、反応させた後、溶液の 45 nm （対象波長 630 nm ）における吸光度を測定した。また、添付の β グルカン標準品を用いて $7.5 \sim 60 \text{ pg/ml}$ の β グルカン溶液を調製し、検量線を得た。該検量線と上記吸光度とから、各 β グルカン希釈液の濃度を算出し、サンプル中の β グルカン量を求めた。

〔分析例2〕（ β グルカンの分子量測定方法）

β グルカンの分子量測定は、以下の通りとした。サンプルに 3 倍量のアルコールを加え、 -20°C に冷却して 10 分間放置し、沈殿を得た。沈殿させた β グルカン 5 mg をチューブに取り、 1 ml の蒸留水を加えて、沸騰水中で溶解させた。該溶液を $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターを通して HPLC 用のサンプルとした。分離には HPLC ゲル濾過カラムである Shodex のパックドカラム KS-805 （昭和電気社製）を用い、流速 0.6 ml/min. 、温度 50°C とし、検出には RI 検出器を用い、水を分離溶媒として用いて実施した。分子量マーカーとしては Shodex プルラン標準液 P-82 （昭和電気社製）を用いて測定した。

〔分析例3〕（培養液中に存在する多糖のプルランに対する純度の測定方法）

プルランを特異的に分解する酵素であるプルラナーゼ（和光純薬工業社製）を用いて、培養液中に生産された多糖のプルランに対する純度を測定した。即ち、プルラナーゼによる酵素消化反応の前後で多糖量を測定し、酵素処理後の多糖量（プルラナーゼにより消化されない多糖量）と酵素処理前の多糖量とから生成多糖のプルランに対する純度を算出した。以下に多糖量の測定方法を詳述する。

まず、プルラナーゼ酵素希釈液 $50 \mu\text{L}$ にクエン酸 Buffer （ 10 mmol/L クエン酸— 20 mmol/L リン酸 Buffer （ $\text{pH} 6.0$ ）） 2 mL を加えたものを酵素溶液とした。ポジティブコントロールとして、プルラン（東

京化成工業社製)を 10 mg/mL に希釈した溶液を標準サンプル溶液として用いた。培養液あるいは標準サンプルを $30\text{ }\mu\text{L}$ ずつ、2本のサンプルチューブ(1.5 mL 容量)に量り取り、一方に酵素溶液 $30\text{ }\mu\text{L}$ を加え、一方にPBS $30\text{ }\mu\text{L}$ を加え、 37°C にて1時間反応させた。反応終了後、各サンプルに、3倍量のエタノールを加えた。良く攪拌し、 -15°C にて10分間インキュベートした後、 4°C 、 15000 rpm で10分間遠心分離を行い、上清を捨て、チューブを乾燥させ沈殿を得た。沈殿に蒸留水 $100\text{ }\mu\text{L}$ を加え、攪拌し、5重量%フェノール水溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$ を加え、速やかに硫酸 $500\text{ }\mu\text{L}$ を加え発色させた。冷却後、96穴マイクロプレートに $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ分注し、蒸留水に5重量%フェノール水溶液及び硫酸を添加した場合をブランクとして、 490 nm の吸光度を測定した。また、プルランを 10 mg/mL ~ $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ に希釈した溶液で検量線を作成した。該検量線と上記吸光度とから、酵素消化反応前後の培養液中の多糖量をそれぞれ定量し、培養液中に存在する多糖のプルランに対する純度を算出した。なお、標準サンプルであるプルラン溶液を酵素消化した場合、 10 mg/mL 溶液では90%以上の消化率が、 1 mg/mL の濃度の溶液では95%以上、 0.1 mg/mL 以下では98%以上の消化率が得られた。以上のように、プルランが生成している場合は、プルナーゼの作用により、酵素処理後のフェノール硫酸値(吸光値)は低値となり、例えば吸光値が50%減少している場合は、多糖のプルランに対する純度は50%と算出した。

〔製造例1〕(キノコ由来 β グルカンの調製)

1) キノコ抽出液の調製

カワリハラタケの子実体を破碎し、粉碎して、その粉碎物 10 kg に熱水 50 リットルを加え、煮沸条件下で穏やかに攪拌しながら3時間、熱水抽出処理した。熱水抽出処理した後、遠心分離して、その分離液を得た。

2) キノコ抽出液の精製物の調製

上記1)で得た分離液に3倍量の99%エチルアルコールを加えて、沈殿物を得て、凍結乾燥して、粗精製物 1200 g (キノコ由来 β グルカン粗精製物: サンプルA)を得た。サンプルAの 1 g 中に含まれる β グルカン量は、 860 mg と算出された。また、最大ピークの分子量は 100 万を示した。

3) キノコ酵素処理抽出物の調製

アガリックスブラゼイの子実体 1 kg に 2 リットルの水を加えて、ミキサーで破碎した。これに 2 g のファンセラゼ（ヤクルト社製）を添加して混合し、55℃で3時間、酵素反応を実施した。ついで、85℃に昇温し、10分間保持して酵素活性を失活させた。3 リットルの蒸留水を加えよく混合した後、残渣を除去し抽出液 4.5 リットル（キノコ酵素処理βグルカン抽出液：サンプルB）を得た。サンプルBの1 ml 中に含まれるβグルカン量は、93 mg と算出された。また、分子量は1万～80万に分布し、最大ピークは12万であった。

4) キノコ菌糸体培養物の調製

500 ml 容の三角フラスコにグルコース馬鈴薯煮汁培地（グルコース2%、馬鈴薯200 g/l）を120 ml 分注し、120℃、30分間滅菌を行い、別に斜面培養保存してあるエノキタケの菌糸（*Flammulina velutipes*）IFO-30602 を接種して、25℃で回転式培養装置にて200 rpm で10日間の培養を行った。この三角フラスコ4本分を合わせて、生理食塩水で培地を洗浄し、凍結乾燥させて、乾燥菌糸体8 g を得た。得られた菌糸体1 g に10 ml の0.2 M 水酸化ナトリウム溶液を加えて、15℃にて1昼夜、攪拌抽出を行った。抽出物はそのまま塩酸にてpH 3.0 とし、120℃にて30分間オートクレーブ処理した。遠心分離により上清を得てから、リン酸2ナトリウムにてpH 7.0 とし、3倍量のエチルアルコールを加えて沈殿を得た。沈殿に10 ml の蒸留水を加えサンプルCを得た。サンプルCの1 ml 中に含まれるβグルカン量は、40 mg と算出された。また、最大ピークの分子量は20万であった。

〔製造例2〕（微生物由来βグルカンの調製）

1) 菌体細胞壁の調製

リゾレシチンを0.5% となるように溶解させた水に、菌体を1 g/ml の濃度となるように懸濁し、超音波破碎器にて10分間処理し、遠心分離にて上清を除去して、沈殿を凍結乾燥し、細胞壁成分とした。乳酸菌菌体として、市販の森永乳酸菌末（森永乳業社製）を使用して得られたものを乳酸菌体細胞壁（サンプルD）とし、酵母菌体として市販の圧搾パン酵母（ダイヤイースト：協和発酵社製）を使用して得られたものを酵母菌体細胞壁（サンプルE）とし、クロレラ菌

体として市販の乾燥クロレラである、クロレラマイクロパウダー（日本クロレラ工業社製）を使用して得られたものをクロレラ菌体細胞壁（サンプルF）とした。各サンプルの10mgに1M水酸化ナトリウム溶液1mlを加え、50℃にて1昼夜抽出操作を実施した。遠心分離後の上清を蒸留水で100倍から10倍希釈系列を作成し、 β グルカンの測定を実施したところ、各サンプル10mg中の β グルカン量は、サンプルDは2.8mg、サンプルEは4.9mg、サンプルFは3.5mgと算出された。次に分子量測定を実施した。各サンプルの10mgに1M水酸化ナトリウム溶液1mlを加え、50℃にて1昼夜抽出操作を実施し、遠心分離した上清に3倍量のエタノールを加え、沈殿物を1mlの蒸留水に溶解させた。各サンプルの平均重量分子量は、サンプルDが120万、サンプルEは200万、サンプルFは180万であった。

〔製造例3〕（細胞壁からのアルカリ抽出物の調製）

1) キノコ細胞壁からのアルカリ抽出物の調製

ハナビラタケ試料100gに1%水酸化ナトリウムの1リットルを加え、65℃にて2時間攪拌抽出を行った。抽出残渣を遠心分離で除去後、抽出液はHClにて中和してから、等量のエタノールを加えて沈殿物20g（キノコ細胞壁抽出 β グルカン：サンプルG）を得た。サンプルGの1g中に含まれる β グルカン量は、500mgと算出された。また、最大ピークの分子量は120万であった。

2) 微生物細胞壁からのアルカリ抽出物の調製

市販の圧搾パン酵母より調製された細胞壁（酵母菌体細胞壁E）の100gに2%水酸化ナトリウムの1リットルを加えて、4℃にて24時間攪拌抽出した。遠心分離した抽出液をHClで中和し、2倍量のエタノールで沈殿させ、20gの抽出物（酵母菌体細胞壁抽出 β グルカン：サンプルH）を得た。サンプルHの10mg中に含まれる β グルカン量は、4.2mgと算出された。また、最大ピークの分子量は160万であった。

〔製造例4〕（微生物培養液の調製）

1) 乳酸菌培養液の調製

ベディオコッカスダンノーサス (*Pediococcus damnosus*) 菌株（大阪発酵研究所に保存のIFO-3896株）を、ポリペプトン (Polypepton) 5g、イーストエキス (Yea

st extract) 5 g、グルコース(Glucose) 5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g、蒸留水 1 リットルの割合で混合溶解し、pH 5.5 に調整した培地 5 リットルに植菌し、5 日間、30℃にて通気せず攪拌(50 rpm)培養した。培養を 2 回実施して 10 リットルの培養液を得た。この培養液を遠心分離して得た上清を減圧濃縮し、2 リットルの培養濃縮液を得た。得られた濃縮液の 2 倍量のエタノールを加えて沈殿を回収し、凍結乾燥して粉末 15 g (乳酸菌培養物：サンプル I) を得た。サンプル I の 1 g 中に含まれる β グルカン量は、600 mg と算出された。また、最大ピークの分子量は 190 万であった。

2) アウレオバシジウム(Aureobasidium) 培養物の調製

アウレオバシジウム(Aureobasidium) 属に属する微生物として遺伝的・形態学的に同定され、培養することによって菌体外に β 結合を有するグルコース重合体を生産するアウレオバシジウムプルランス(Aureobasidium pullulans) の菌株である IF07757 株を、ポテトデキストロース寒天斜面培地で培養して保存菌株とし、YM 液体培地(ディフコ社製) 100 ml を入れた 500 ml 容三角フラスコに接種して、28℃にて 3 日間前培養した。本培養は、フルゾーン翼を搭載した 5 リットル容発酵槽に、クザベック(Czapek's) 培地(ディフコ社製) 3 リットル、得られた前培養物を添加して 28℃にて 5 日間培養した。なお培養中、pH は 5.0 となるように調整し、通気は 1 vvm となるように通気量と回転数をシーケンス制御した。培養液 3 リットルを 90℃にて 30 分間加熱殺菌した後、遠心分離によって菌体を除去し、その内の 1 リットルをそのまま凍結乾燥して 27 g の凍結乾燥物を得た(Aureobasidium 培養物：サンプル J)。サンプル J の 1 g 中に含まれる β グルカン量は、440 mg と算出された。また、サンプル J の 10 mg/ml 蒸留水溶液にプルラナーゼ酵素の懸濁液(和光順薬社製)を 0.05% となるように添加し、2 時間反応させた後、2 倍量のエタノールを加え、得られた沈殿に、再度 1 ml の蒸留水を加え溶解させ、分子量の測定を実施した。なお、対照としてプルラン 10 mg/ml 蒸留水溶液を同様に操作したものも分子量測定を行った。その結果、サンプル J の最大ピークの分子量は 20 万であった。プルラン溶液ではピークは認めなかった。

残りの培養液 2 リットルに 2 倍量のエタノールを加えて沈殿物を回収した。沈

殿物を凍結乾燥して、粉末として26gを得た(Aureobasidium 培養精製物: サンプルK)。サンプルKの10mg中に含まれる β グルカン量は、6mgと算出された。また、サンプルKの10mg/ml蒸留水溶液にプルナーゼ酵素の懸濁液(和光順薬社製)を0.05%となるように添加し、2時間反応させた後、2倍量のエタノールを加え、得られた沈殿に、再度1mlの蒸留水を加え溶解させ、分子量の測定を実施した。なお、対照としてプルラン10mg/ml蒸留水溶液を同様に操作したものも分子量測定を行った。その結果、サンプルKの最大ピークの分子量は20万であった。プルラン溶液ではピークは認めなかった。

〔実施例1〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルAの100部と大豆油100部をニダーでよく混合し、60℃で10分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-1 (β グルカン含有量43%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例2〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルBの80部と大豆油120部をニダーでよく混合し、60℃で10分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-2 (β グルカン含有量3.7%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例3〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルHの100部と大豆油100部をニダーでよく混合し、60℃で10分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-3 (β グルカン含有量21%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例4〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルKの300部に70℃に加温して溶解させたパーム油100部およびレシチン1部を添加し、高速ホモミキサーで混合して、50℃で20分間放置後、室温に冷却してそばろ状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-4 (β グルカン含有量44.9%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例5〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルEの300部に70℃に加温して溶解させたパーム油100部およびレシチン1部を添加し、高速ホモミキサーで混合して、50℃で20分間放置後、室温に冷却してそばろ状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-5 (β グルカン含有量36.6%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例6〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルFの300部に70℃に加温して溶解させたパーム油100部およびレシチン1部を添加し、高速ホモミキサーで混合して、50℃で20分間放置後、室温に冷却してそばろ状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-6 (β グルカン含有量26%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例7〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルGの50部にパームオレイン油30部、菜種油70部、プロテアーゼによって加水分解処理した卵黄0.2部を添加し、ミキサーで混合して、65℃で15分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-7 (β グルカン含有量16.6%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例8〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルIの50部にパームオレイン油30部、菜種油70部、プロテアーゼによって加水分解処理した卵黄0.2部を添加し、ミキサーで混合して、65℃で15分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-8 (β グルカン含有量20%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例9〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルKの50部にパームオレイン油30部、菜種油70部、プロテアーゼによって加水分解処理した卵黄0.2部を添加し、ミキサーで混合して、65℃で15分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明の β グルカン含有油脂組成物-9 (β グルカン含有量20%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例10〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルAの5部に米油40部、オリーブ油20部および紅花油35部を

添加し、高速ホモミキサーで混合して、50℃で30分間放置後、室温に冷却して粘度はほとんど原料油と変わらないが若干濁りを生じた本発明の β グルカン含有油脂組成物-10 (β グルカン含有量4.3%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例11〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルIの5部に米油40部、オリーブ油20部および紅花油35部を添加し、高速ホモミキサーで混合して、50℃で30分間放置後、室温に冷却して粘度はほとんど原料油と変わらないが若干濁りを生じた本発明の β グルカン含有油脂組成物-11 (β グルカン含有量3%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例12〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルJの5部に米油40部、オリーブ油20部および紅花油35部を添加し、高速ホモミキサーで混合して、50℃で30分間放置後、室温に冷却して粘度はほとんど原料油と変わらないが若干濁りを生じた本発明の β グルカン含有油脂組成物-12 (β グルカン含有量2.2%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例13〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルGの13部に硬化大豆油20部(融点45℃)、パーム油35部、綿実油30部および大豆リゾレシチン0.2部を加え70℃で10分間放置後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化によりマーガリン様の物性を示す本発明の β グルカン含有油脂組成物-13 (β グルカン含有量6.6%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例14〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルHの13部に硬化大豆油20部(融点45℃)、パーム油35部、綿実油30部および大豆リゾレシチン0.2部を加え70℃で10分間放置後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化によりマーガリン様の物性を示す本発明の β グルカン含有油脂組成物-14 (β グルカン含有量5.6%)を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例15〕 (β グルカン含有油脂組成物)

前記サンプルKの13部に硬化大豆油20部（融点45℃）、パーム油35部、綿実油30部および大豆リゾレシチン0.2部を加え70℃で10分間放置後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化によりマーガリン様の物性を示す本発明の β グルカン含有油脂組成物-15（ β グルカン含有量8%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例16〕（ β グルカン含有油脂組成物）

前記サンプルBの50部に魚硬化油27.6部（融点36℃）、コーンサラダ油18部および酒石酸モノグリセライド0.4部を加え50℃で30分間攪拌混合後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化によりファットスプレッド様の物性を示す本発明の β グルカン含有油脂組成物-16（ β グルカン含有量4.8%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例17〕（ β グルカン含有油脂組成物）

前記サンプルHの50部に魚硬化油27.6部（融点36℃）、コーンサラダ油18部および酒石酸モノグリセライド0.4部を加え50℃で30分間攪拌混合後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化によりファットスプレッド様の物性を示す本発明の β グルカン含有油脂組成物-17（ β グルカン含有量22%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例18〕（ β グルカン含有油脂組成物）

前記サンプルIの50部に魚硬化油27.6部（融点36℃）、コーンサラダ油18部および酒石酸モノグリセライド0.4部を加え50℃で30分間攪拌混合後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化によりファットスプレッド様の物性を示す β グルカン含有油脂組成物-18（ β グルカン含有量31%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例19〕（ β グルカン含有油脂組成物）

前記サンプルGの20部にオリーブ油0.3部（融点36℃）およびカゼインナトリウム0.1部を加え55℃で15分間放置後、高速ミキサーで乳化後、スプレイドライヤーで乾燥させ、粉末化した本発明の β グルカン含有油脂組成物-19（ β グルカン含有量49%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例20〕（ β グルカン含有油脂組成物）

前記サンプルHの20部にオリーブ油0.3部（融点36℃）およびカゼインナトリウム0.1部を加え55℃で15分間放置後、高速ミキサーで乳化後、スプレイドライヤーで乾燥させ、粉末化した本発明のβグルカン含有油脂組成物-20（βグルカン含有量41%）を得た。βグルカンは均一に分散していた。

〔実施例21〕（βグルカン含有油脂組成物）

前記サンプルKの20部にオリーブ油0.3部（融点36℃）およびカゼインナトリウム0.1部を加え55℃で15分間放置後、高速ミキサーで乳化後、スプレイドライヤーで乾燥させ、粉末化した本発明のβグルカン含有油脂組成物-21（βグルカン含有量59%）を得た。βグルカンは均一に分散していた。

〔実施例22〕（ショートニングの製造例）

パーム油30部、パーム硬化油50部、ナタネ油20部およびレシチン0.3部からなる油相を70℃で溶解し、該油相100部に対し、前記サンプルGの5.0部を添加し、70℃にてそのまま30分間放置した。次にホモミキサーにより高速回転で2分間攪拌混合して、本発明のβグルカン含有油脂組成物-22を得た。目視によれば、βグルカンは十分に油脂に分散されていた。その後、急冷可塑化を行った後、5℃まで冷却した。このようにして、本発明のショートニング（βグルカン含有量2.4%）を得た。得られたショートニングについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたショートニングは、下記比較例1のショートニングに比べて、滑らかさと風味に優れていることが分かる。得られたショートニングは、結晶の熟成工程、すなわちエージングを省略しても食感に優れた適度な結晶の生成を形成、促進する効果、乳化剤による風味抑制を防止する効果を有しているといえる。

〔実施例23〕（ショートニングの製造例）

パーム油30部、パーム硬化油50部、ナタネ油20部およびレシチン0.3部からなる油相を70℃で溶解し、該油相100部に対し、前記サンプルKの5.0部を添加し、70℃にてそのまま30分間放置した。次にホモミキサーにより高速回転で2分間攪拌混合して、本発明のβグルカン含有油脂組成物-23を得た。目視によれば、βグルカンは十分に油脂に分散されていた。その後、急冷可塑化を行った後、5℃まで冷却した。このようにして、本発明のショートニン

グ（ β グルカン含有量2.9%）を得た。得られたショートニングについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたショートニングは、下記比較例1のショートニングに比べて、滑らかさと風味に優れていることが分かる。得られたショートニングは、結晶の熟成工程、すなわちエージングを省略しても食感に優れた適度な結晶の生成を形成、促進する効果、乳化剤による風味抑制を防止する効果を有しているといえる。

〔比較例1〕（ショートニングの比較製造例）

パーム油30部、パーム硬化油50部、ナタネ油20部およびレシチン0.3部からなる油相を70℃で溶解し、ホモミキサーにより高速回転で2分間攪拌混合して、その後、急冷可塑化を行った後、5℃まで冷却しショートニングを得た。得られたショートニングについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。得られたショートニングは、風味が非常に劣っていることが分かる。

〔実施例24〕（マーガリンの製造例）

パーム油：パーム硬化油：菜種油：ソルビタン脂肪酸エステルを、30：50：20：0.3の割合（重量比）で含有する食用油脂100部を70℃で融解し、これに前記サンプルGの8部を添加し、65℃にて30分間放置した後、ホモミキサーで攪拌しながら、70℃に加温した水16部に脱脂粉乳0.5部および食塩1部を溶解させた溶液を徐々に添加、混合した後、急冷可塑化を行い、25℃で一晩調温後、5℃まで冷却した。このようにして、本発明のマーガリン（ β グルカン含有量3.2%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたマーガリンについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたマーガリンは、きめの細かい滑らかな食感のよいものであった。さらに下記比較例2のマーガリンに比べて、風味もよく、乳化剤の風味低減を抑制する効果があるといえる。

〔実施例25〕（マーガリンの製造例）

パーム油：パーム硬化油：菜種油：ソルビタン脂肪酸エステルを、30：50：20：0.3の割合（重量比）で含有する食用油脂100部を70℃で融解し、これに前記サンプルHの8部を添加し、65℃にて30分間放置した後、ホモ

ミキサーで攪拌しながら、70℃に加温した水16部に脱脂粉乳0.5部および食塩1部を溶解させた溶液を徐々に添加、混合した後、急冷可塑化を行い、25℃で一晩調温後、5℃まで冷却した。このようにして、本発明のマーガリン(βグルカン含有量2.7%)を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られたマーガリンについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたマーガリンは、きめの細かい滑らかな食感のよいものであった。さらに下記比較例2のマーガリンに比べて、風味もよく、乳化剤の風味低減を抑制する効果があるといえる。

〔実施例26〕(マーガリンの製造例)

パーム油：パーム硬化油：菜種油：ソルビタン脂肪酸エステルを、30：50：20：0.3の割合(重量比)で含有する食用油脂100部を70℃で融解し、これに前記サンプルKの8部を添加し、65℃にて30分間放置した後、ホモミキサーで攪拌しながら、70℃に加温した水16部に脱脂粉乳0.5部および食塩1部を溶解させた溶液を徐々に添加、混合した後、急冷可塑化を行い、25℃で一晩調温後、5℃まで冷却した。このようにして、本発明のマーガリン(βグルカン含有量3.8%)を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られたマーガリンについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたマーガリンは、きめの細かい滑らかな食感のよいものであった。さらに下記比較例2のマーガリンに比べて、風味もよく、乳化剤の風味低減を抑制する効果があるといえる。

〔比較例2〕(マーガリンの比較製造例)

パーム油：パーム硬化油：菜種油：ソルビタン脂肪酸エステルを、30：50：20：0.3の割合(重量比)で含有する食用油脂100部を70℃で融解し、ホモミキサーで攪拌しながら、70℃に加温した水16部に脱脂粉乳0.5部および食塩1部を溶解させた溶液を徐々に添加、混合した後、急冷可塑化を行い、25℃で一晩調温後、5℃まで冷却しマーガリンを得た。得られたマーガリンについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例27〕(ドレッシングの製造例)

前記サンプルGの10部、卵黄10部、食塩1.5部、酢11部、上白糖2.

5部、マスタードパウダー0.05部およびオニオンパウダー0.05部を、ミキサーにより高速で5分間攪拌、混合し、水相とした。該水相を、さらにホモミキサーで高速攪拌しながら、これに大豆サラダ油75部を70℃に加温したものを、徐々に添加、混合し、50℃に10分間放置後、乳化させ、24時間、5℃に冷却し、本発明のドレッシング(βグルカン含有量4.5%)を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られたドレッシングについて、安定性と風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたドレッシングは、安定性と風味に優れていることが分かる。

〔比較例3〕(ドレッシングの比較製造例)

卵黄10部、食塩1.5部、酢11部、上白糖2.5部、マスタードパウダー0.05部およびオニオンパウダー0.05部を、ミキサーにより高速で5分間攪拌、混合し、水相とした。以後は実施例27と同様に操作し、ドレッシングを得た。得られたドレッシングについて、安定性と風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例28〕(ドレッシングの製造例)

卵黄10部、食塩1.5部、酢11部、上白糖2.5部、マスタードパウダー0.05部およびオニオンパウダー0.05部を、ミキサーにより高速で5分間攪拌、混合し、水相とした。該水相を、さらにホモミキサーで高速攪拌しながら、これに実施例12のβグルカン含有油脂組成物-12の75部を、徐々に添加、混合し、乳化させ、24時間、5℃に冷却し、本発明のドレッシング(βグルカン含有量1.65%)を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られたドレッシングについて、安定性と風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたドレッシングは安定性と風味に優れていることが分かる。

〔比較例4〕(ドレッシングの比較製造例)

卵黄10部、食塩1.5部、酢11部、上白糖2.5部、マスタードパウダー0.05部およびオニオンパウダー0.05部を、ミキサーにより高速で5分間攪拌、混合し、水相とした。該水相を、さらにホモミキサーで高速攪拌しながら、これに油脂(米油40部、オリーブ油20部および紅花油35部を混合したもの)75部を、徐々に添加、混合し、乳化させ、24時間、5℃に冷却し、ドレ

ッシングを得た。得られたドレッシングについて、安定性と風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 29〕（マヨネーズの製造例）

前記サンプル H の 30 部に大豆サラダ油 30 部を添加し、攪拌して予備乳化後、本発明の β グルカン含有油脂組成物を得た。これに、卵黄 9 部、デンプン 5.2 部、砂糖 8.2 部、食塩 2.8 部、食酢 8 部、調味香辛料 1 部および水 6 部をよく混合したものを添加し、コロイドミルによって仕上げ乳化を行い、本発明のマヨネーズ（ β グルカン含有量 12.6 %）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたマヨネーズについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたマヨネーズは、1 ヶ月の保存期間中に水の分離がなく、また、滑らかで風味も非常に良好であった。

〔比較例 5〕（マヨネーズの比較製造例）

水 30 部に大豆サラダ油 30 部を添加し、攪拌して予備乳化後、油脂組成物を得た。これに、卵黄 9 部、デンプン 5.2 部、砂糖 8.2 部、食塩 2.8 部、食酢 8 部、調味香辛料 1 部および水 6 部をよく混合したものを添加し、コロイドミルによって仕上げ乳化を行い、マヨネーズを得た。得られたマヨネーズについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 30〕（マヨネーズの製造例）

卵黄 9 部、砂糖 8.2 部、食塩 2.8 部、食酢 8 部、調味香辛料 1 部およびサンプル B の 36 部を混合し、水相を調製した。これに菜種油 25 部、実施例 3 の β グルカン含有油脂組成物 3 の 10 部を添加し、攪拌して予備乳化後、コロイドミルによって仕上げ乳化を行い、本発明のマヨネーズ（ β グルカン含有量 5.5 %）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたマヨネーズについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたマヨネーズは、1 ヶ月の保存期間中に水の分離がなく、また、滑らかで風味も非常に良好であった。

〔比較例 6〕（マヨネーズの比較製造例）

卵黄 9 部、砂糖 8.2 部、食塩 2.8 部、食酢 8 部、調味香辛料 1 部および 36 部の水を混合し、水相を調製した。これに菜種油 25 部、パーム油 10 部を添

加し、攪拌して予備乳化後、コロイドミルによって仕上げ乳化を行い、マヨネーズを得た。得られたマヨネーズについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 3 1〕（ファットスプレッドの製造例）

魚硬化油（融点 36℃）27.6 部、綿実油 18.4 部、前記サンプル K の 40 部、水 12.3 部、食塩 1 部、脱脂粉乳 0.5 部、フレーバー 0.2 部およびレシチン 0.3 部を乳化、急冷可塑化により本発明のファットスプレッド（ β グルカンの含有量 24%）を調製した。 β グルカンは均一に分散していた。得られたファットスプレッドについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたファットスプレッドは、1 ヶ月の保存期間中に水の分離がなく、また、滑らかで風味も良好であった。

〔比較例 7〕（ファットスプレッドの比較製造例）

魚硬化油（融点 36℃）27.6 部、綿実油 18.4 部、水 52.3 部、食塩 1 部、脱脂粉乳 0.5 部、フレーバー 0.2 部およびレシチン 0.3 部を乳化、急冷可塑化によりファットスプレッドを調製した。得られたファットスプレッドについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 3 2〕（カレールーの製造例）

小麦粉（薄力粉）44 部および実施例 2 2 で得られたショートニング 34 部をキツネ色になるまで炒め、さらに市販のカレー粉 8 部を加え、本発明のカレールー（ β グルカン含有量 0.95%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。

〔実施例 3 3〕（クッキーの製造例）

実施例 9 で得られた β グルカン含有油脂組成物 9 の 50 部と上白糖 50 部とをホバートミキサーにて高速 6 分クリーミングし、これに全卵（正味）15 部、食塩 1 部および重炭酸 0.5 部を合わせたものを添加し、中速で 30 秒間混合した。さらに、篩にかけた小麦粉 100 部を添加混合し、低速で 30 秒間混合して、生地を得た。この生地を直径 6 cm の筒につめ、生地を厚み 1 cm ずつ押し出したところでカットし、200℃、13 分間焼成して、本発明のクッキー（ β グルカン含有量 4.6%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたクッキーについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。

〔比較例 8〕（クッキーの比較製造例）

油脂（パームオレイン油 30 部、菜種油 70 部、プロテアーゼによって加水分解した卵黄 0.2 部を混合したもの）50 部と上白糖 50 部とをホバートミキサーにて高速 6 分クリーミングし、これに全卵（正味）15 部、食塩 1 部および重炭酸 0.5 部を合わせたものを添加し、中速で 30 秒間混合した。以後は実施例 33 と同様に操作し、クッキーを得た。得られたクッキーについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 34〕（クッキーの製造例）

実施例 14 で得られた β グルカン含有油脂組成物 14 の 50 部とビート上白糖 40 部とをホバートミキサーにて高速 6 分クリーミングし、これにレーズンペースト 20 部を添加し、中速で 30 秒間混合した。更に、篩にかけた粟粉を添加混合し、低速で 30 秒間混合して、生地を得た。この生地を直径 6 cm の筒につめ、生地を厚み 1 cm ずつ押し出したところでカットし、160℃、15 分間焼成して、本発明のクッキー（ β グルカン含有量 2.5%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたクッキーについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたクッキーは、卵、乳製品を使用しないにも拘わらず食感のよいものが得られた。

〔比較例 9〕（クッキーの比較製造例）

硬化大豆油 20 部（融点 45℃）、パーム油 35 部、綿実油 30 部および大豆リゾレシチン 0.2 部を加え 70℃で 10 分間放置後、高速ミキサーで乳化後、急冷可塑化により得られたマーガリン様の物性を示す食用油脂組成物 50 部とビート上白糖 40 部とをホバートミキサーにて高速 6 分クリーミングし、これにレーズンペースト 20 部を添加し、中速で 30 秒間混合した。以後は実施例 34 と同様に操作し、クッキーを得た。得られたクッキーについて、硬さと風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 35〕（チョコレート製造例）

カカオマス 12 部、粉糖 45 部、全粉乳 20 部、カカオバター 23 部および前記サンプル G の 2 部を配合のうち、カカオバター 10 部を残し、他の原料をホバートミキサーに投入し、ピーターを用いて中速で 3 分間混合し、さらに、ロール

掛け、コンチングして、本発明の β グルカン含有油脂組成物を得た（ β グルカン含量1%）。目視によれば、 β グルカンは均一に分散していた。この本発明の β グルカン含有油脂組成物に、残るカカオバターを投入、混合してチョコレートの原液を得、これをテンパリング処理後、型に流し込み、冷却し、本発明のチョコレートを得た。得られたチョコレートについて、滑らかさ、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたチョコレートは、口溶けのよい風味が良好なものであった。

〔比較例10〕（チョコレートの比較製造例）

カカオマス12部、粉糖45部、全粉乳20部、カカオバター23部および油脂（パームオレイン油30部、菜種油70部およびプロテアーゼ処理卵黄0.2部を混合したもの）2部を配合のうち、カカオバター10部を残し、他の原料をホバートミキサーに投入し、ビーターを用いて中速で3分間混合し、さらに、ロール掛け、コンチングして、油脂組成物を得た。この油脂組成物に、残るカカオバターを投入、混合して、以後は実施例35と同様に操作し、チョコレートを得た。得られたチョコレートについて、滑らかさ、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例36〕（チョコレートの製造例）

カカオマス12部、粉糖45部、全粉乳20部、カカオバター23部および実施例4で得た β グルカン含有油脂組成物-4の20部をホバートミキサーに投入し、ビーターを用いて中速で3分間混合し、さらに、ロール掛け、コンチングして、これをテンパリング処理後、型に流し込み、冷却し、本発明のチョコレートを得た（ β グルカン含量15%）。 β グルカンは均一に分散していた。得られたチョコレートについて、滑らかさ、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたチョコレートは、口溶けのよい風味が良好なものであった。

〔比較例11〕（チョコレートの比較製造例）

カカオマス12部、粉糖45部、全粉乳20部、カカオバター23部およびパーム油20部をホバートミキサーに投入し、以後は実施例36と同様に操作して、チョコレートを得た。得られたチョコレートについて、滑らかさ、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例 3 7〕（食パンの製造例）

実施例 2 6 で得られた β グルカン含有マーガリンを使用して食パンを製造した。小麦粉 1 0 0 部、イースト 3 部、砂糖 4 部、食塩 2 部、実施例 2 6 で得られたマーガリン 6 部および水 6 0 部を加え、こね上げ温度 2 8℃にて、ホッパーミキサーで低速 2 分、高速 4 分、ミキシングしパン生地を調製した。2 8℃で 6 0 分間発酵させ、4 5 0 g に分割、丸め、ねかし（2 8℃、2 0 分）、シーターに 3 回通して整形後、ワンローフタイプの型に挿入した。ホイロは、3 8℃で相対湿度 9 0 % の条件下、型上縁 2 c m まで実施し、4 2 分を要した。焼成は、2 2 0℃にて 2 3 分間行い、本発明の食パン（ β グルカン含有量 0 . 1 6 %）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られた食パンについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られた食パンは、ソフトでボリュームのある品質で食感も良好であった。

〔比較例 1 2〕（食パンの比較製造例）

実施例 2 6 で得られたマーガリンの代わりに、 β グルカン（サンプル K）を配合しない以外は実施例 2 6 と同様にして得られたマーガリンを使用して、以後は実施例 3 7 と同様に操作して食パンを製造した。得られた食パンについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 3 8〕（食パンの製造例）

小麦粉 1 0 0 部、イースト 3 部、砂糖 4 部、食塩 2 部、実施例 1 9 で得られた粉末化した β グルカン含有油脂組成物—1 9 の 2 部、ショートニング 4 部、サンプル B の 3 0 部および水 3 3 部を加え、こね上げ温度 2 8℃にて、ホッパーミキサーで低速 2 分、高速 4 分、ミキシングし、パン生地を調製した。2 8℃で 6 0 分間発酵させ、4 5 0 g に分割、丸め、ねかし（2 8℃、2 0 分）、シーターに 3 回通して整形後、ワンローフタイプの型に挿入した。ホイロは、3 8℃で相対湿度 9 0 % の条件下、型上縁 2 c m まで実施し、4 6 分を要した。焼成は、2 1 0℃にて 3 0 分間行い、本発明の食パン（ β グルカン含有量 2 . 5 %）を得た。食パン中に β グルカンは均一に分散していた。得られた食パンについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られた食パンは、ソフトでボリュームのある品質で食感も良好であった。

〔比較例 13〕（食パンの比較製造例）

小麦粉 100 部、イースト 3 部、砂糖 4 部、食塩 2 部、 β グルカン（サンプル G）を配合しない以外は実施例 19 と同様にして得られた粉末油脂組成物 2 部、ショートニング 4 部および水 63 部を加え、こね上げ温度 28℃にて、ホッパーミキサーで低速 2 分、高速 4 分、ミキシングし、パン生地を調製した。以後は実施例 38 と同様に操作し、食パンを得た。得られた食パンについて、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 39〕（米飯の製造例）

新潟産コシヒカリを水でよく研ぎ、その 100 部に水 60 部、実施例 3 で得られた β グルカン含有油脂組成物-3 を 4 部添加し、電気炊飯器にて炊飯し、本発明の米飯（ β グルカン含有量 0.51%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られた米飯について、硬さを評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られた米飯は、ふっくらとした食感の良好なものであった。

〔比較例 14〕（米飯の比較製造例）

新潟産コシヒカリを水でよく研ぎ、その 100 部に水 60 部、大豆油を 4 部添加し、電気炊飯器にて炊飯し、米飯を得た。得られた米飯について、硬さを評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 40〕（ポップコーンの製造例）

ナベにトウモロコシ 100 部、食塩 2 部、実施例 10 で得られた β グルカン含有油脂組成物-10 の 10 部を入れ、ふたをして直火で加熱し、本発明のポップコーン（ β グルカン含有量 0.38%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたポップコーンについて、滑らかさを評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたポップコーンは、さらっとしており食感は滑らかで良好であった。

〔実施例 41〕（豆腐の製造例）

実施例 22 で製造したショートニングを用いて豆腐を製造した。水で浸漬処理した大豆 100 部に水 140 部を加えて磨砕し、100℃で 5 分間沸騰させた。煮汁は木綿袋に入れ、圧搾濾過し、豆乳を得た。ここに凝固剤（硫酸カルシウム）3 部、実施例 22 で製造したショートニングを 10 部添加し、静かに攪拌して

から、75℃にて凝固させ、木綿布を敷いたザルに流し込み30分間放置して本発明品の豆腐（βグルカン含有量0.095%）を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られた豆腐について、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られた豆腐は、良好な食感であった。

〔比較例15〕（豆腐の比較製造例）

水で浸漬処理した大豆100部に水140部を加えて磨碎し、100℃で5分間沸騰させた。煮汁は木綿袋に入れ、圧搾濾過し、豆乳を得た。ここに凝固剤（硫酸カルシウム）3部、βグルカン（サンプルG）を配合しない以外は実施例2と同様にして製造したショートニングを10部添加し、静かに攪拌してから、75℃にて凝固させ、木綿布を敷いたザルに流し込み30分間放置して豆腐を得た。得られた豆腐について、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例42〕（ソフトチョコレートの製造例）

砂糖50部、カカオマス5部、全脂粉乳15部、実施例4で得られたβグルカン含有油脂組成物-4を30部、レシチン0.3部およびバニリン0.04部からなる配合で、常法に従いロール掛け、コンチング処理し、本発明のソフトチョコレート（βグルカン含有量13.5%）を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られたソフトチョコレートについて、滑らかさ、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表1に示す。得られたソフトチョコレートは、ブルームが発生せず、風味も良好であった。

〔比較例16〕（ソフトチョコレートの比較製造例）

砂糖50部、カカオマス5部、全脂粉乳15部、パーム油30部、レシチン0.3部およびバニリン0.04部からなる配合で、常法に従いロール掛け、コンチング処理し、ソフトチョコレートを得た。得られたソフトチョコレートについて、滑らかさ、硬さ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例43〕（無水クリームの製造例）

実施例23で製造したショートニング35部、砂糖45部、呈味パウダー10部および粉乳10部を混合し、本発明の無水クリーム（βグルカン含有量1%）を得た。βグルカンは均一に分散していた。得られた無水クリームについて、滑

らかさと風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られた無水クリームは、口溶けがよく、風味が非常に良好であった。

〔比較例 17〕（無水クリームの比較製造例）

β グルカン（サンプル K）を配合しない以外は実施例 23 と同様にして製造したショートニング 35 部、砂糖 45 部、呈味パウダー 10 部および粉乳 10 部を混合し、無水クリームを得た。得られた無水クリームについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 44〕（サンドクリームの製造例）

実施例 23 で製造したショートニング 100 部およびモノグリセライド 0.1 部を混合し、ホイップし、比重を 0.3 とした。そしてシロップ 100 部を添加し、さらにホイップし、比重 0.65 の本発明のサンドクリーム（ β グルカン含有量 1.45%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたサンドクリームについて、滑らかさと風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたサンドクリームは、風味が非常に良好であった。

〔比較例 18〕（サンドクリームの比較製造例）

β グルカン（サンプル K）を配合しない以外は実施例 23 と同様にして製造したショートニング 100 部を用いた以外は実施例 44 と同様に操作し、サンドクリームを得た。得られたサンドクリームについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 45〕（ハードキャンディーの製造例）

実施例 1 の β グルカン含有油脂組成物-1 を 100 部、実施例 6 の β グルカン含有油脂組成物-6 を 100 部、ポリグリセリン脂肪酸エステル 23 部、グリセリン脂肪酸エステル 14 部およびショ糖脂肪酸エステル 4 部を添加混合した油脂組成物の 35 部、砂糖 35 部、水飴 8.5 部、脱脂粉乳 1.5 部および水 40 部を混合して、水中油型乳化物とし、これを 140℃ になるまで煮詰め、水分含量が 1.9% となるまで水をとばし、冷却、成形し、本発明のハードキャンディー（ β グルカン含有量 12.5%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたハードキャンディーについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたハードキャンディーは保存中の油のしみだしがな

く、風味も良好であった。

〔比較例 19〕（ハードキャンディーの比較製造例）

大豆油 100 部、パーム油 100 部、ポリグリセリン脂肪酸エステル 23 部、グリセリン脂肪酸エステル 14 部およびショ糖脂肪酸エステル 4 部を添加混合した油脂組成物の 35 部、砂糖 35 部、水飴 8.5 部、脱脂粉乳 1.5 部および水 40 部を混合して、水中油型乳化物とし、これを 140℃ になるまで煮詰め、水分含量が 1.9% となるまで水をとばし、冷却、成形し、ハードキャンディーを得た。得られたハードキャンデーについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 2 にした。

〔実施例 46〕（ホイップクリームの製造例）

水 50 部を 60℃ に昇温し、攪拌しながら、脱脂粉乳 5 部およびトリポリリン酸ナトリウム 0.1 部を溶解した水相を調製した。別に実施例 3 の β グルカン含有油脂組成物-3 を 10 部、実施例 4 の β グルカン含有油脂組成物-4 を 20 部および実施例 7 の β グルカン含有油脂組成物-7 を 15 部を混合した油相を用意し、上記の水相に該油相を混合攪拌し、予備乳化物を調製した。予備乳化後 5 MPa の圧力で均質化した後、VTIS 殺菌機で 142℃、4 秒間殺菌し、再度 5 MPa の圧力で均質化後 5℃ まで冷却した。その後、冷蔵庫で 24 時間エージングを行い、本発明のホイップクリーム（ β グルカン含有量 13.6%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたホイップクリームについて、安定性、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたホイップクリームは、オーバーラン、乳化安定性、耐熱保形、風味、口溶け、造花性のいずれもが良好であった。

〔比較例 20〕（ホイップクリームの比較製造例）

水 50 部を 60℃ に昇温し、攪拌しながら、脱脂粉乳 5 部およびトリポリリン酸ナトリウム 0.1 部を溶解した水相を調製した。別に大豆油 10 部、パーム油 20 部および菜種油 15 部を混合した油相を用意し、上記の水相に該油相を混合攪拌し、予備乳化物を調製した。以後は実施例 46 と同様に操作し、ホイップクリームを得た。得られたホイップクリームについて、安定性、風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 4 7〕（乳代替組成物の製造例）

水 6 4 部を 6 0℃に昇温し、攪拌しながら、脱脂粉乳 2 5 部、ヘキサメタリン酸ナトリウム 0. 2 部、クエン酸ナトリウム 0. 2 部およびショ糖脂肪酸エステル 0. 3 部を溶解した水相に、実施例 1 7 の β グルカン含有油脂組成物－1 7 を 1 0 部、グリセリン脂肪酸エステル 0. 3 部を添加、混合攪拌し、予備乳化物を調製した。予備乳化後 5 M p a の圧力で均質化した後、V T I S 殺菌機で 1 4 2℃、4 秒間殺菌し、再度 1 5 M p a の圧力で均質化後 5℃まで冷却し、本発明の乳代替組成物（ β グルカン含有量 2. 2 %）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られた乳代替組成物について、安定性、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られた乳代替組成物は、風味、乳化安定性のいずれも良好であった。

〔比較例 2 1〕（乳代替組成物の比較製造例）

水 6 4 部を 6 0℃に昇温し、攪拌しながら、脱脂粉乳 2 5 部、ヘキサメタリン酸ナトリウム 0. 2 部、クエン酸ナトリウム 0. 2 部およびショ糖脂肪酸エステル 0. 3 部を溶解した水相に、 β グルカン（サンプル H）を配合しない以外は実施例 1 7 と同様に製造した油脂組成物 1 0 部およびグリセリン脂肪酸エステル 0. 3 部を添加、混合攪拌し、予備乳化物を調製した。以後は実施例 4 7 と同様に操作し、乳代替組成物を得た。得られた乳代替組成物について、安定性と風味を評価した。その結果を下記表 2 に示す。

〔実施例 4 8〕（生活習慣病予防作用を有する食品（マーガリン）の製造例）

硬化大豆油（融点 4 5℃）1 0 部、パーム油 3 5 部、実施例 3 の β グルカン含有油脂組成物－3 の 1 0 部、植物ステロールあるいは植物ステロール脂肪酸エステルを 1 0 %以上含有するエステル交換油 3 0 部、前記サンプル K の 1 3. 3 部、食塩 1 部、脱脂粉乳 0. 5 部およびフレーバー 0. 2 部を乳化、急冷可塑化により本発明のコレステロール低下作用を有するマーガリン（ β グルカン含有量 1 0 %）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られたコレステロール低下作用を有するマーガリンについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表 1 に示す。得られたマーガリンは、口溶けのよい、風味が良好なマーガリンであった。

〔比較例 2 2〕（生活習慣病予防作用を有する食品（マーガリン）の比較製造例）

硬化大豆油（融点 45℃）10部、パーム油35部、大豆油の10部、植物ステロールあるいは植物ステロール脂肪酸エステルを10%以上含有するエステル交換油30部、水13.3部、食塩1部、脱脂粉乳0.5部およびフレーバー0.2部を乳化、急冷可塑化によりコレステロール低下作用を有するマーガリンを得た。得られたコレステロール低下作用を有するマーガリンについて、滑らかさ、風味を評価した。その結果を下記表2に示す。

〔実施例 4 9〕（生活習慣病予防作用を有する医薬品の製造例）

高純度DHA（純度98%、POV1.0meq/kg以下）に4000ppmとなるように α トコフェロールを添加したもの3部、前記サンプルKの20部およびカゼインナトリウム10部を加え窒素下、高速ミキサーで乳化後、スプレイドライヤーで乾燥させ、粉末化した本発明の生活習慣病予防作用を有する医薬品（ β グルカン含有量36.4%）を得た。 β グルカンは均一に分散していた。得られた生活習慣病予防作用を有する医薬品について、安定性を評価した。その結果を下記表1に示す。得られた医薬品は、POVが0.8meq/kgと酸化安定性に優れたものであった。

〔比較例 2 3〕（生活習慣病予防作用を有する医薬品の比較製造例）

高純度DHA（純度98%、POV1.0meq/kg以下）に4000ppmとなるように α トコフェロールを添加したもの3部、水20部およびカゼインナトリウム10部を加え窒素下、高速ミキサーで乳化後、スプレイドライヤーで乾燥させ、粉末化した生活習慣病予防作用を有する医薬品を得た。得られた生活習慣病予防作用を有する医薬品について、安定性を評価した。その結果を下記表2に示す。得られた医薬品は、POVが1.4meq/kgと酸化安定性の劣るものであった。

上記の実施例および比較例における安定性、食感（滑らかさ、硬さ、風味）は次のようにして評価した。なお、下記の表1および2中の－は、評価をしていないことを示す。

・安定性の評価方法

安定性は5℃で1ヶ月保存後の状態変化を目視で確認し、下記3段階の評価基準で評価した。

＜評価基準＞

○：安定性に優れている。

△：やや分離等、外観に変化がみられる。

×：分離がみられる。

・食感（滑らかさ、硬さ、風味）の評価方法

食感については、パネラー10名により、それぞれ下記3段階の評価基準で評価を行ない、最も人数の多い評価を評価結果とした。

＜評価基準＞

（滑らかさ）

○：非常に滑らかである。

△：滑らかである。

×：滑らかでない。

（硬さ）

○：非常にソフトである。

△：ソフトである。

×：ソフトでない。

（風味）

○：優れている。

△：やや劣っている。

×：劣っている。

〔表 1〕

実施例	安定性	食感		
		滑らかさ	硬さ	風味
実施例 22	—	○	—	○
実施例 23	—	○	—	○
実施例 24	○	○	—	○
実施例 25	○	○	—	○
実施例 26	○	○	—	○
実施例 27	○	—	—	○
実施例 28	○	—	—	○
実施例 29	○	○	—	○
実施例 30	○	○	—	○
実施例 31	○	○	—	○
実施例 33	—	—	○	○
実施例 34	—	—	○	○
実施例 35	—	○	○	○
実施例 36	—	○	○	○
実施例 37	—	—	○	○
実施例 38	—	—	○	○
実施例 39	—	—	○	—
実施例 40	—	○	—	—
実施例 41	—	○	—	○
実施例 42	—	○	○	○
実施例 43	—	○	—	○
実施例 44	—	○	—	○
実施例 45	○	○	—	○
実施例 46	○	○	—	○
実施例 47	○	—	—	○
実施例 48	—	○	—	○
実施例 49	○	—	—	—

〔表 2〕

比較例	安定性	食感		
		滑らかさ	硬さ	風味
比較例 1	—	△	—	×
比較例 2	○	○	—	△
比較例 3	△	—	—	△
比較例 4	△	—	—	○
比較例 5	×	○	—	△
比較例 6	×	△	—	△
比較例 7	△	○	—	△
比較例 8	—	—	△	△
比較例 9	—	—	△	△
比較例 10	—	○	△	△
比較例 11	—	○	△	△
比較例 12	—	—	△	○
比較例 13	—	—	△	○
比較例 14	—	—	△	—
比較例 15	—	○	—	△
比較例 16	—	○	△	×
比較例 17	—	○	—	×
比較例 18	—	○	—	×
比較例 19	△	○	—	△
比較例 20	△	—	—	×
比較例 21	△	—	—	△
比較例 22	—	△	—	×
比較例 23	×	—	—	—

次に本発明の新規な微生物について実施例を挙げて具体的に説明する。試験例 1～2 においては、本発明の微生物の菌株のスクリーニング方法を示し、試験例 3～7 においては、ADK-34 菌株の菌学的性質を示す。また、実施例 50～52 は、ADK-34 菌株を用いた本発明の β グルカンの製造方法の実施例を示す。分析に関しては、前記分析例 1～3 と同様に行なった。

〔試験例 1〕 菌株のスクリーニング方法 1

日本において伝統的な保存食を中心に、通常、加熱調理せず摂取する市販の食

品の表面に付着・生育している微生物を広く分離し、 β グルカンを生産する菌株をスクリーニングした。スクリーニング方法を以下に詳述する。

まず、対象サンプルである食品を滅菌シャーレに入れ、これに滅菌したPBS 10 mlを加え、滅菌済みスポイトを用いてサンプル表面をPBSで繰り返し洗浄し、サンプルの表面を洗浄した洗浄液を得た。得られた洗浄液を滅菌したPBSで10～100倍希釈し、この200 μ lをプレートに添加し、コンラージ棒で広げ、2週間、室温で培養した。プレートは、YM培地（ディフコ社製）に、クロラムフェニコールを100 μ g/ml、寒天を1.5重量%となるようにそれぞれ添加した培地を20 ml入れ、固化させたものを用いた。生育したコロニー約2万のうち、生育初期に乳白色で、次第にコロニー全体に光沢を生じ湿潤したコロニーを形成したもの、コロニー全体に光沢を生じ、中心部がわずかに黄色・褐色、あるいは黄色・褐色の輪郭を生じ、湿潤したコロニーを形成したもの、全体が乳白色～ピンク色を呈するコロニーを形成したもの、次第に緑黒色となり毛羽立った特徴を有するコロニーが形成されたもの、以上の4形質を示すコロニーから釣菌した。なお、コロニー全体がピンク色となるが、上部に盛り上がり外周部への拡がり認められない、光沢のないコロニーは除外した。釣菌した菌株は、単菌分離操作を実施し、再度7日間培養した後、顕微鏡観察によって出芽型分生子が観察されるもの、及び酵母様生育が認められるものを残し、分生子枝が観察されたものについては除外し、第1スクリーニング結果とした。

次に、第1スクリーニングにより得られた菌株を液体培養した。即ち、YM培地に5重量%となるようにシュクロースを添加した培地を調製し、24穴マイクロプレートを用いて、26℃、4日間の培養を行い、培養液を得た。生育した菌株が培養液全体に均一に分散し、かつ粘性を呈する培養液を与える菌株を残し、第2スクリーニング結果とした。

次に、第2スクリーニング結果により得られた菌株を単菌分離し、YM液体培地に植菌し、26℃にて96時間培養を実施した。得られた培養液に等量の蒸留水を加え、121℃にて20分間の滅菌後、培養液を遠心分離（8,000 rpm）して培養上清を得た。培養上清30 μ lに2倍量のエタノールを加え、遠心分離（1000 rpm、10 min）にて沈殿を得て、100 μ lの蒸留水を加

え、全多糖量をフェノール硫酸法にて測定し、培地について同様の操作をして得られた値より高値となったものを陽性と判定した。陽性のものを第3スクリーニング結果とした。

対象サンプルから分離・培養して生育した約2万コロニーから、第1スクリーニングにて180菌株、第2スクリーニングにて50菌株、第3スクリーニングにて14菌株を得た。第3スクリーニングで得られた菌株並びに（財）大阪発酵研究所から得た3菌株、即ちIFO-4466株、IFO-6353株及びIFO-7757株について、培養上清中の β グルカン量を前記分析例1に示す測定方法により測定するとともに、前記分析例3に示す測定方法により培養液中の生成多糖のプルランに対する純度を測定した。その結果を表3に示す。ADK-34菌株が生成する多糖は、プルラナーゼによって消化されず、その多糖量は β グルカン定量値にほぼ一致するものであり、 β グルカンが純度良く生成されていると結論された。

〔表 3〕

菌株名	フェノール硫酸値 (490nm)		純度 (%)	βグルカン量 (mg/ml)
	酵素処理前	酵素処理後		
ADK-1	1.067	0.389	36.5	0.12
ADK-4	1.183	0.504	42.6	0.23
ADK-5	1.655	1.042	63	1.34
ADK-6	1.364	0.764	56	0.649
ADK-8	1.344	0.914	68	0.674
ADK-10	1.469	0.646	44	0.357
ADK-17	1.224	0.759	62	0.411
ADK-20	1.003	0.552	55	0.264
ADK-24	1.141	0.776	68	0.888
ADK-27	1.225	0.882	72	0.954
ADK-28	1.377	0.565	41	0.5
ADK-31	1.419	0.426	30	0.311
ADK-34	1.366	1.369	100	1.89
ADK-42	1.154	0.427	37	0.44
IFO-6353	1.455	0.757	52	0.743
IFO-7757	0.975	0.722	74	0.684
IFO-4466	0.736	0.521	71	0.701
プルラン1mg/ml	0.755	0.016	3.9	0
プルラン0.5mg/ml	0.411	0.009	2.2	0

〔試験例 2〕 菌株のスクリーニング方法 2

抗生物質シクロヘキシミドを $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した培地を用いたこと以外は、試験例 1 と同様にして、菌株のスクリーニングを実施した。その結果、対象サンプルから分離・培養して生育した 4000 コロニーから、第 1 スクリーニングにて 30 菌株、第 2 スクリーニングにて 10 菌株、第 3 スクリーニングにて 3 菌株 (ADK-71 菌株、ADK-77 菌株、ADK-82 菌株) が得られた。第 3 スクリーニングで得られた菌株について、試験例 1 と同様にして、βグルカン量及び生成多糖のプルランに対する純度を測定した。その結果を表 4 に

示す。

また、第3スクリーニングの結果得られた3菌株について形態学的な観察から菌株同定をそれぞれ試みた。YM寒天培地に植菌後、26℃、7日間培養したところ、3菌株のコロニーはいずれも、全体に光沢を生じ、中心部が黄色の輪郭を生じ、湿潤したコロニーを形成した。これらのプレートを4℃に移管して7日間保存することで、中心部の黄色は黒緑色へ変化した。ADK-71菌株及びADK-77菌株それぞれのコロニー全体は変化せず、白色～ピンク色であった。ADK-82菌株はコロニー全体が黒色化した。また、これらの3菌株それぞれをYM液体培地で26℃にて3日間培養した菌体の顕微鏡観察では、3菌株いずれにおいても出芽型の分生子が認められ、酵母様の生育であった。また、これらの3菌株それぞれをYM寒天培地で26℃にて7日間培養したコロニーの菌体は、3菌株いずれにおいても、分生子がつながった鎖状に生育した菌体が観察されたが、分生子枝は認められなかった。以上から、3菌株はアウレオバシジウム プルランスと判定した。

〔表4〕

菌株名	フェノール硫酸値(490nm)		純度(%)	βグルカン量 (mg/ml)
	酵素処理前	酵素処理後		
ADK-71	0.882	0.893	101	1.22
ADK-77	0.741	0.842	114	0.936
ADK-82	0.633	0.655	103	0.854
プルラン1mg/ml	0.768	0.015	2	0
プルラン0.5mg/ml	0.393	0.005	1.3	0

〔試験例3〕形態的・培養的性質

試験例1で得られた菌株の中で、ADK-34菌株について、YM培地（1重量%グルコース、0.5重量%ペプトン、0.3重量%酵母エキス、0.3重量%マルトエキストラクト、pH6.0）で26℃、3日間培養した後、顕微鏡で観察した所見を示すと、細胞の大きさは短径2～2.5μm、長径5～10μm

、形状は卵形、表面は平滑で無色、運動性はなかった。また、菌糸はごくわずかで、幅は $2.5\mu\text{m}$ であった。不均一で表面は平滑無色であった。酵母様の出芽分生子が形成された。

〔試験例4〕寒天平板培養

試験例1で得られた菌株の中で、ADK-34菌株について、ポテトデキストロース寒天培地（栄研）で 26°C にて7日間培養した。その時の所見を以下に示す。3日間の培養で、生育は良好であり、形態は円形で、全縁がギザギザで、コロニー全体に光沢があり、表面の状態は平滑、色調は白色であった。また、Colony（コロニー）は、5日間の培養で表面が平滑で淡灰白色となり、酵母様に発育し、7日間の培養でColony表面はピンク色となった。 26°C にて7日間培養したプレートを、 4°C にて7日間冷蔵したところ、若干ピンク色が濃くなったが、コロニー全体に変化はなかった。

〔試験例5〕液体培養

試験例1で得られた菌株の中で、ADK-34菌株について、YM培地で培養した。その時の最適生育温度及び最適生育pHを示すと、最適生育温度は 26°C であり、最適生育pHは $5.0\sim 7.0$ であり、生育開始時のpHは 6.2 で、培養終了後のpHは 7.5 であった。好ましい発育温度は $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ で、最適温度は 26°C 、発育可能温度は $5\sim 40^{\circ}\text{C}$ であった。グルコース、フラクトース、マンノース等のヘキソース、スクロース等の二糖類並びにデンプンを分解し、いずれの炭素源でも、培養液は、粘稠になり、特有の芳香を有した。

試験例3～5の結果、本発明の微生物のうち、ADK-34菌株は菌学的特徴からアウレオバシジウム属の菌株と同定された。

〔試験例6〕シクロヘキシミド耐性試験

試験例1及び2のスクリーニングで得られた菌株、並びに（財）大阪発酵研究所に保存されている、IFO-4466株、IFO-6353株、及びIFO-7757株について、各菌株のシクロヘキシミド耐性試験を実施した。即ち、各菌株をYM寒天培地（ディフコ社製）にて 26°C で5日間生育させた。YM寒天培地（ディフコ社製）にシクロヘキシミドを $5, 10, 20, 40, 80\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように添加した培地をそれぞれ調製し、上記の生育させておい

た菌株を滅菌した楊子でこれらのシクロヘキシミド含有培地に植菌し、26℃にて10日間の培養後、生育したコロニーの有無を観察し、生育した場合はコロニーの直径を測定した。その結果を表5に示す。

〔表5〕

単位：mm

菌株名	シクロヘキシミド濃度 ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	5	10	20	40	80
ADK-1	16.5	0	0	0	0	0
ADK-4	17.3	8.5	0	0	0	0
ADK-5	15.6	6.3	0	0	0	0
ADK-6	14.4	7.1	0	0	0	0
ADK-8	16.8	7.7	1.1	0	0	0
ADK-10	14.9	8.5	0	0	0	0
ADK-17	12.7	6.7	0	0	0	0
ADK-20	13.3	6.2	0	0	0	0
ADK-24	15.6	9.1	2.5	0	0	0
ADK-27	17.4	10.3	0	0	0	0
ADK-28	15.4	7.1	0	0	0	0
ADK-31	16.8	6.3	1.7	0	0	0
ADK-34	15.5	13.6	6.7	5.1	3.7	0.5
ADK-42	12.7	2.4	0	0	0	0
ADK-71	13.7	7.6	4.1	1.8	1.2	0
ADK-77	15.4	9.5	4.1	0.8	0	0
ADK-82	16.8	10.4	2.9	1.5	1.2	0
IFO-7757	17.5	0	0	0	0	0
IFO-6353	15.6	7.3	2.3	0	0	0
IFO-4466	14.8	4.4	0	0	0	0

表3及び表5から明らかなように、IFO-4466株、IFO-6353株、及びIFO-7757株は、シクロヘキシミドに耐性を持たず、生産される β グルカンのプルランに対する純度は低いものであった。一方、表3～5から明ら

かなように、食品からの分離菌株の中で、シクロヘキシミドに耐性を有する菌株（ADK-34菌株、ADK-71菌株、ADK-77菌株、ADK-82菌株）は、 β グルカンをプルランに対して純度よく生産し、シクロヘキシミドに耐性のない菌株の多くは、生産された β グルカンのプルランに対する純度が低い結果となった。

〔試験例7〕18S rRNA遺伝子の遺伝子解析

スクリーニングの結果得られたADK-34菌株について、18S rRNA遺伝子の1732bpの塩基配列を以下のようにして決定した。ADK-34菌株をポテトデキストロース培地（ディフコ社）にて振とう培養し、遠心分離、蒸留水による洗浄を3回行い、DNA抽出用菌体を得た。この菌体からFastPrepFP120 (Qbiogene)とFastDNA-kit (Qbiogene)を用いて細胞破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)によりゲノムDNA分離を行った。このゲノムDNAを鋳型として、Ready-To-Go PCR Beads (Amersham-Pharmacia Biotech) とプライマーNS1及びNS8を用いてPCR増幅を行った。

プライマーNS1とNS8の塩基配列は、NS1：(5'→3') GTAGTCATATGCTTGTCTC、NS8：(5'→3') TCCGCAGGTTACCTACGGAを用いた。サーマルサイクラーはgeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems)を用いた。反応終了後、PCR産物をQIAquickPCR purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。このDNAフラグメントを直接シーケンシング反応に供し、塩基配列解析はABI Prism377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)を用いて実施した。類似の塩基配列はDNAデータベース (DDBJ, DNA Data Bank of Japan) からBLASTを利用して検索した。

その結果を配列表の配列番号1に示す。また、得られた塩基配列に基づいてデータベース検索を行い、同菌株と類縁菌との相同性を調べた結果を表6～8に示す。決定された塩基配列（配列番号1）、相同性検索結果（表6～8）より、ADK-34菌株はアウレオバシジウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) との相同性が100%であり、完全に一致した。この結果から、本菌株はアウレオバシジウム プルランスであると判定された。

〔表 6〕

Sequences producing significant alignments:			(bits) Value
AY030322 AY030322.1	Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	3433 0.0	1732/1732 (100%)
M55639 M55639.1	Aureobasidium pullulans 16S-like ribosomal RNA ...	3429 0.0	1731/1732 (99%)
U42474 U42474.1	Dothidea inculpta 18S small subunit ribosomal ...	3237 0.0	1699/1721 (98%)
U42475 U42475.1	Dothidea hippophaeos 18S small subunit ribosoma...	3221 0.0	1691/1713 (98%)
U77668 U77668.1	Coccodinium bartschii 18S ribosomal RNA gene, p...	3178 0.0	1690/1719 (98%)
AF258607 AF258607.1	Scytalidium hyalinum strain IP252699 18S ri...	3158 0.0	1699/1733 (98%),
AF258606 AF258606.1	Scytalidium hyalinum strain IP151783 18S ri...	3158 0.0	1699/1733 (98%),
AB041250 AB041250.1	Phyllosticta pyrolae gene for 18S rRNA, par...	3158 0.0	1699/1733 (98%),
AB041249 AB041249.1	Guignardia endophyllicola gene for 18S rRNA...	3150 0.0	1698/1733 (97%),
AB041248 AB041248.1	Guignardia endophyllicola gene for 18S rRNA...	3150 0.0	1698/1733 (97%),
AB041247 AB041247.1	Guignardia endophyllicola gene for 18S rRNA...	3150 0.0	1698/1733 (97%)
Y11716 Y11716.1	P.dematoides 18S rRNA gene.	3148 0.0	1697/1732 (97%),
U42477 U42477.1	Botryosphaeria ribis 18S small subunit ribosoma...	3144 0.0	1689/1722 (98%),
Y18702 Y18702.1	Sarcinomyces petricola 18S rRNA gene, strain CB...	3108 0.0	1693/1733 (97%),
D49656 D49656.1	Lasioderma serricorne yeast-like symbiote DNA f...	3102 0.0	1692/1733 (97%),
AJ224362 AJ224362.1	Bulgaria inquinans 18S rDNA.	3094 0.0	1691/1733 (97%),
AF088239 AF088239.1	Lecidea fuscoatra 18S ribosomal RNA, partia...	3033 0.0	1666/1710 (97%),
Y18693 Y18693.1	Hortaea werneckii 18S rRNA gene, strain CBS 107...	3027 0.0	1679/1731 (96%)
AF088253 AF088253.1	Umbilicaria subglabra 18S ribosomal RNA, pa...	3015 0.0	1648/1689 (97%),
Y11355 Y11355.1	S.crustaceus 18S rRNA gene.	3001 0.0	1674/1731 (96%),
U42478 U42478.1	Sporormia lignicola 18S small subunit ribosomal...	2991 0.0	1665/1717 (96%)
AF184755 AF184755.1	Metus conglomeratus small subunit ribosomal...	2991 0.0	1678/1733 (96%),
AB016175 AB016175.1	Euascomycetes sp. K89 gene for 18S rRNA, pa...	2985 0.0	1680/1733 (96%),
AF184753 AF184753.1	Cladonia rangiferina small subunit ribosoma...	2976 0.0	1676/1733 (96%),
AF140236 AF140236.1	Stereocaulon paschale small subunit ribosom...	2976 0.0	1676/1733 (96%),
AB015778 AB015778.1	Pseudogymnoascus roseus 18S rRNA gene, part...	2972 0.0	1640/1687 (97%)
AF184756 AF184756.1	Pilophorus cereolus small subunit ribosomal...	2968 0.0	1675/1733 (96%),
AF184761 AF184761.1	Stereocaulon vesuvianum small subunit ribos...	2960 0.0	1674/1733 (96%),
AF184754 AF184754.1	Heterodea muelleri small subunit ribosomal ...	2960 0.0	1674/1733 (96%),
AF168167 AF168167.1	Dark septate endophyte DS16b 18S ribosomal ...	2960 0.0	1661/1713 (96%),
AF184757 AF184757.1	Pilophorus robustus small subunit ribosomal...	2952 0.0	1673/1733 (96%),
AF117984 AF117984.1	Hypogymnia physodes nuclear small subunit r...	2952 0.0	1665/1720 (96%),
AF088246 AF088246.1	Rhizocarpon geographicum 18S ribosomal RNA,...	2946 0.0	1643/1693 (97%),
AF241544 AF241544.1	Cladonia sulphurina small subunit ribosomal...	2944 0.0	1672/1733 (96%),
AB015776 AB015776.1	Byssoascus striatosporus 18S rRNA gene, par...	2940 0.0	1636/1687 (96%)

[表 7]

Sequences producing significant alignments:			(bits) Value
AF140233 AF140233.1	Alectoria sarmentosa small subunit ribosoma...	2938 0.0	1671/1733 (96%),
U70960 U70960.1	Pilophorus acicularis 18S small subunit ribosom...	2936 0.0	1671/1733 (96%),
AF085471 AF085471.1	Baeomyces rufus 18S small subunit ribosomal...	2932 0.0	1638/1691 (96%)
U70961 U70961.1	Stereocaulon ramulosum 18S small subunit riboso...	2928 0.0	1670/1733 (96%),
AF088238 AF088238.1	Lasallia rossica 18S ribosomal RNA, partial...	2926 0.0	1654/1708 (96%),
Y14210 Y14210.1	Monilinia laxa 18S rRNA gene, exon 1, partial.	2916 0.0	1636/1691 (96%)
U42476 U42476.1	Botryosphaeria rhodina 18S small subunit riboso...	2914 0.0	1619/1671 (96%),
U86692 U86692.1	Stenocybe pullatula 18S SSU ribosomal RNA, part...	2910 0.0	1640/1696 (96%),
AF117992 AF117992.1	Xanthoparmelia conspersa nuclear small subu...	2910 0.0	1664/1728 (96%),
AF085475 AF085475.1	Cladonia subcervicornis 18S small subunit r...	2910 0.0	1637/1692 (96%),
AF085465 AF085465.1	Stereocaulon taeniarum 18S small subunit ri...	2910 0.0	1634/1688 (96%),
AB015787 AB015787.1	Oidiodendron tenuissimum 18S rRNA gene, iso...	2910 0.0	1634/1688 (96%),
AF140235 AF140235.1	Cornicularia normoerica small subunit ribos...	2908 0.0	1663/1727 (96%),
AB015777 AB015777.1	Myxotrichum deflexum 18S rRNA gene, isolate...	2908 0.0	1632/1687 (96%)
AF184759 AF184759.1	Psora decipiens small subunit ribosomal RNA...	2904 0.0	1667/1733 (96%),
AF117981 AF117981.1	Neophyllis melacarpa nuclear small subunit ...	2904 0.0	1667/1733 (96%),
AF088251 AF088251.1	Stereocaulon ramulosum 18S ribosomal RNA, p...	2904 0.0	1652/1713 (96%),
AF088245 AF088245.1	Pseudevernia cladoniae 18S ribosomal RNA, p...	2902 0.0	1638/1696 (96%)
AF201452 AF201452.1	Rhytidhysterium rufulum 18S ribosomal RNA ge...	2900 0.0	1578/1615 (97%),
AF274110 AF274110.1	Lepolichen coccophorus 18S ribosomal RNA ge...	2898 0.0	1660/1725 (96%),
AF117991 AF117991.1	Pleurosticta acetabulum nuclear small subun...	2898 0.0	1664/1730 (96%),
U43463 U43463.1	Mycosphaerella mycopappi small subunit nuclear ...	2894 0.0	1664/1732 (96%)
AF085466 AF085466.1	Stereocaulon vesuvianum 18S small subunit r...	2894 0.0	1632/1688 (96%),
AB033475 AB033475.1	Blumeria graminis f. sp. bromi gene for 18S...	2894 0.0	1660/1724 (96%),
U42485 U42485.1	Lophiostoma crenatum 18S small subunit ribosoma...	2892 0.0	1655/1719 (96%),
AF053726 AF053726.1	Kirschsteiniethelia maritima small subunit ...	2890 0.0	1659/1726 (96%)
AF201455 AF201455.1	Tubeufia helicoma 18S ribosomal RNA gene, p...	2886 0.0	1586/1628 (97%),
AF241541 AF241541.1	Xanthoria parietina small subunit ribosomal...	2884 0.0	1653/1719 (96%)
U70959 U70959.1	Leifidium tenerum 18S small subunit ribosomal R...	2880 0.0	1664/1733 (96%),
AF282910 AF282910.1	Lichinella cribellifera 18S small subunit r...	2880 0.0	1667/1733 (96%),
AF117986 AF117986.1	Cetraria islandica nuclear small subunit ri...	2880 0.0	1646/1709 (96%),
L37540 L37540.1	Porpidia crustulata (Ach.) Hertel and Knoph nuc...	2878 0.0	1570/1608 (97%),
AF184751 AF184751.1	Cladia retipora small subunit ribosomal RNA...	2874 0.0	1636/1697 (96%),

〔表 8〕

Sequences producing significant alignments:	(bits) Value
AF282913 AF282913.1 <i>Peltula obscurans</i> 18S small subunit ribosom... 2872 0.0	1663/1732 (96%),
AF085474 AF085474.1 <i>Pycnothelia papillaria</i> 18S small subunit ri... 2872 0.0	1618/1673 (96%),
AB033479 AB033479.1 <i>Leveillula taurica</i> gene for 18S ribosomal RNA. 2865 0.0	1654/1720 (96%),
AF117985 AF117985.1 <i>Parmelia saxatilis</i> nuclear small subunit ri... 2859 0.0	1653/1722 (95%),
AF088254 AF088254.1 <i>Xanthoria elegans</i> 18S ribosomal RNA, partia... 2855 0.0	1655/1724 (95%),
AF117988 AF117988.1 <i>Usnea florida</i> nuclear small subunit ribosom... 2853 0.0	1635/1699 (96%),
U42483 U42483.1 <i>Herpotrichia juniperi</i> 18S small subunit ribosom... 2847 0.0	1649/1720 (95%),
AF140234 AF140234.1 <i>Alectoria ochroleuca</i> small subunit ribosoma... 2847 0.0	1598/1652 (96%),
AF091587 AF091587.1 <i>Scoliciosporum umbrinum</i> 18S ribosomal RNA g... 2847 0.0	1625/1688 (96%),
AF085469 AF085469.1 <i>Pilophorus acicularis</i> 18S small subunit rib... 2845 0.0	1613/1671 (96%),
AF010590 AF010590.1 <i>Ascozonus woolhopensis</i> SSU ribosomal RNA ge... 2841 0.0	1654/1727 (95%),
AF117990 AF117990.1 <i>Vulpicida juniperina</i> nuclear small subunit ... 2831 0.0	1624/1688 (96%),
Z30239 Z30239.1 <i>S.flavida</i> gene for 18S ribosomal RNA. 2819 0.0	1638/1711 (95%),
AB016174 AB016174.1 <i>Geomyces pannorum</i> gene for 18S rRNA, partia... 2809 0.0	1544/1588 (97%),
AB016173 AB016173.1 <i>Geomyces asperulatus</i> gene for 18S rRNA, par... 2809 0.0	1544/1588 (97%),
AF117987 AF117987.1 <i>Evernia prunastri</i> nuclear small subunit rib... 2807 0.0	1621/1688 (96%),
AF184749 AF184749.1 <i>Bunodophoron australe</i> small subunit ribosom... 2805 0.0	1619/1687 (95%),
AF241540 AF241540.1 <i>Caloplaca flavorubescens</i> small subunit ribo... 2795 0.0	1624/1694 (95%),
AF091583 AF091583.1 <i>Lecidella meiococca</i> 18S ribosomal RNA gene,... 2795 0.0	1626/1697 (95%),
AF282914 AF282914.1 <i>Pterygiopsis guyanensis</i> 18S small subunit r... 2771 0.0	1654/1734 (95%),
U72713 U72713.1 <i>Cladia aggregata</i> 18S small subunit ribosomal RN... 2755 0.0	1597/1665 (95%),
AF091589 AF091589.1 <i>Lecania cyrtella</i> 18S ribosomal RNA gene, pa... 2753 0.0	1635/1713 (95%),
AF085468 AF085468.1 <i>Alloctraria madreporiformis</i> 18S small subu... 2732 0.0	1536/1592 (96%),
AF088250 AF088250.1 <i>Squamarina lentigera</i> 18S ribosomal RNA, par... 2692 0.0	1623/1710 (94%),
AF201453 AF201453.1 <i>Aliquandostipite khaoyaiensis</i> 18S ribosomal... 2684 0.0	1603/1684 (95%),
AF258605 AF258605.1 <i>Scytalidium dimidiatum</i> strain IP252899 18S ... 2615 0.0	1374/1391 (98%),
AF258604 AF258604.1 <i>Scytalidium dimidiatum</i> strain IP252799 18S ... 2615 0.0	1374/1391 (98%),
AF258603 AF258603.1 <i>Scytalidium dimidiatum</i> strain IP127881 18S ... 2615 0.0	1374/1391 (98%),
AB033477 AB033477.1 <i>Arthrocladiella mougeotii</i> gene for 18S ribo... 2613 0.0	1418/1450 (97%),
U45438 U45438.1 <i>Amylocarpus encephaloides</i> small subunit rRNA gene. 2605 0.0	1441/1481 (97%),
AF274113 AF274113.1 <i>Coccotrema pocillarium</i> 18S ribosomal RNA ge... 2375 0.0	1351/1401 (96%),
AF184752 AF184752.1 <i>Cladonia gracilis</i> subsp. <i>turbinata</i> small su... 2226 0.0	1239/1277 (97%),

〔試験例 8〕 ITS-5. 8S rRNA 遺伝子

スクリーニングにより得られた ADK-34 菌株並びに IFO-6353 株及び IFO-7757 株について、ITS-5. 8S rRNA 遺伝子の 563 塩基配列あるいは 564 塩基配列を決定した。各菌株をポテトデキストロース培地（ディフコ社）にて振とう培養し、遠心分離、蒸留水による洗浄を 3 回行い、DNA 抽出用菌体を得た。この菌体から FastPrepFP120 (Qbiogene) と FastDNA-kit (Qbiogene) を用いて細胞破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) によりゲノム DNA 分離を行った。このゲノム DNA を鋳型として、Ready-To-Go PCR Beads (Amersham-Pharmacia Biotech) とプライマー ITS 5 および ITS 4 を用いて PCR 増幅を行った。プライマー ITS 4 と ITS 5 の塩基配列は、ITS 4 : (5' → 3') TCCTCCGCTTATTGATATGC、ITS 5 : (5' → 3') GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG である。サーマルサイクラーは geneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) を用いた。反応終了後、PCR 産物を QIAquickPCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。この DNA フラグメントを直接シーケンシング反応に供し、塩基配列解析は ABI Prism377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて実施した。類似の塩基配列は DNA データベース (DDBJ, DNA Data Bank of Japan) から BLAST を利用して検索した。

ADK-34 菌株の結果を配列表の配列番号 2 に、IFO-6353 株の結果を配列番号 3 に、IFO-7757 株の結果を配列番号 4 にそれぞれ示す。また、得られた塩基配列に基づいてデータベース検索を行い、同菌株と類縁菌との相同性を調べた結果を表 9 及び 10 に示す。決定された塩基配列を比較したところ、ADK-34 菌株と IFO-6353 株及び IFO-7757 株とは異なり、完全一致しなかった。ADK-34 菌株と IFO-6353 株との相同性は 98%、ADK-34 菌株と IFO-7757 株との相同性は 98% であった。また、相同性検索結果（表 9 及び 10）より、ADK-34 菌株の ITS-5. 8S 領域の 563 塩基対が完全一致する菌株は、報告されていなかった。IFO-6353 株は、報告されている アウレオバシジウム プルランス 菌株である登録番号「AJ276062」と 100%（表 11）、即ち完全一致し、IFO-7757 株は報告されている アウレオバシジウム プルランス 菌株である登録番号「

AJ276062」と99%で一致した(表12)。ADK-34菌株は登録番号「AJ276062」と98%の一致率であった。

以上から、ADK-34菌株は、これまでに報告されているアウレオバシジウム プランス菌株とはITS-5.8S領域の塩基配列の一部が異なり、新菌株であると判定された。

[表 9]

Sequences producing significant alignments:			(bits) Value
AF013229 AF013229.1	Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	997 0.0	555/567 (97%),
AY029406 AY029406.1	Astasia longa internal transcribed spacer 1...	989 0.0	538/546 (98%),
AJ276062 AJ276062.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	971 0.0	517/526 (98%)
AF121287 AF121287.1	Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	971 0.0	507/510 (99%),
AJ244265 AJ244265.1	Trimmatostroma abietina 5.8S rRNA gene and ...	965 0.0	503/507 (99%),
AJ244231 AJ244231.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	965 0.0	503/507 (99%),
AJ244235 AJ244235.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	963 0.0	501/506 (99%)
AJ244234 AJ244234.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	963 0.0	501/506 (99%)
AF121285 AF121285.1	Aureobasidium pullulans strain ATCC48433 in...	952 0.0	501/508 (98%)
AF121281 AF121281.1	Aureobasidium pullulans strain ATCC11942 in...	952 0.0	501/508 (98%)
AJ244232 AJ244232.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	948 0.0	499/506 (98%)
AF182377 AF182377.1	Hormonema sp. F-054,764 internal transcribe...	940 0.0	501/510 (98%)
AF121284 AF121284.1	Aureobasidium pullulans strain ATCC42457 in...	936 0.0	499/508 (98%)
AJ244233 AJ244233.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	934 0.0	492/499 (98%)
AJ244269 AJ244269.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	932 0.0	497/506 (98%)
AJ244236 AJ244236.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	932 0.0	497/506 (98%)
AF121286 AF121286.1	Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	920 0.0	497/508 (97%)
AJ276061 AJ276061.1	Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	914 0.0	497/505 (98%),
AJ244252 AJ244252.1	Kabatiella lini 5.8S rRNA gene and internal...	906 0.0	496/508 (97%),
AJ244251 AJ244251.1	Kabatiella caulivora 5.8S rRNA gene and int...	825 0.0	487/508 (95%),
AF013225 AF013225.1	Phaeocryptopus gaeumannii 18S ribosomal RNA...	446 e-124	361/398 (90%),
AJ244257 AJ244257.1	Pringsheimia smilacis 5.8S rRNA gene and in...	428 e-118	255/264 (96%),
AJ244248 AJ244248.1	Hormonema prunorum 5.8S rRNA gene and inter...	420 e-116	253/264 (95%),
AJ244245 AJ244245.1	Dothiora rhamni-alpinae 5.8S rRNA gene and ...	420 e-116	252/264 (95%)
AJ244242 AJ244242.1	Dothichiza pityophila 5.8S rRNA gene and in...	418 e-115	246/255 (96%),
AF182376 AF182376.1	Kabatina juniperi internal transcribed spac...	416 e-115	251/262 (95%),
AF182375 AF182375.1	Hormonema sp. ATCC74360 internal transcribe...	416 e-115	251/262 (95%),
AJ244243 AJ244243.1	Dothiora cannabinae 5.8S rRNA gene and inte...	412 e-113	252/264 (95%),
AF027764 AF027764.1	Dothidea insculpta CBS 189.58 18S ribosomal...	412 e-113	252/264 (95%),
AF013226 AF013226.1	Kabatina thujae 18S ribosomal RNA gene, par...	412 e-113	251/264 (95%),
AF027763 AF027763.1	Dothidea hippophaeos CBS 186.58 18S ribosom...	404 e-111	251/264 (95%),
AJ278930 AJ278930.1	Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r...	402 e-110	244/255 (95%),
AJ278929 AJ278929.1	Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r...	402 e-110	244/255 (95%),
AJ278928 AJ278928.1	Hormonema dematioides 18S rRNA gene (partia...	402 e-110	244/255 (95%),
AJ278927 AJ278927.1	Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r...	402 e-110	244/255 (95%),

〔表 10〕

Sequences producing significant alignments:	(bits) Value
AJ278926 AJ278926.1 <i>Hormonema dematioides</i> 5.8S rRNA gene, 26S r... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ278925 AJ278925.1 <i>Hormonema dematioides</i> 5.8S rRNA gene, 26S r... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ244262 AJ244262.1 <i>Sydowia polyspora</i> 5.8S rRNA gene and intern... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ244247 AJ244247.1 <i>Hormonema macrosporum</i> 5.8S rRNA gene and in... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ244244 AJ244244.1 <i>Dothiora europaea</i> 5.8S rRNA gene and intern... 402 e-110	252/263 (95%),
AF182378 AF182378.1 <i>Hormonema</i> sp. F-054,258 internal transcribe... 402 e-110	240/251 (95%),
AF013232 AF013232.1 <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> 18S ribosomal RNA g... 402 e-110	244/255 (95%),
AF013228 AF013228.1 <i>Hormonema dematioides</i> 18S ribosomal RNA gen... 402 e-110	244/255 (95%),
AF260224 AF260224.1 <i>Kabatina juniperi</i> 18S ribosomal RNA, partia... 396 e-109	250/264 (94%),
AF013231 AF013231.1 <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> 18S ribosomal RNA g... 389 e-106	244/256 (95%),
AF121283 AF121283.1 <i>Aureobasidium pullulans</i> strain ATCC16629 in... 379 e-103	238/251 (94%),
AF121282 AF121282.1 <i>Aureobasidium pullulans</i> strain ATCC16628 in... 379 e-103	238/251 (94%),
AF013230 AF013230.1 <i>Rhizosphaera pini</i> 18S ribosomal RNA gene, p... 375 e-102	244/257 (94%),
AF246930 AF246930.1 <i>Botryosphaeria mamane</i> isolate 97-59 18S rib... 359 2e-97	214/225 (95%)
AF246929 AF246929.1 <i>Botryosphaeria mamane</i> isolate 97-58 18S rib... 359 2e-97	214/225 (95%)
AF243410 AF243410.1 <i>Sphaeropsis sapinea</i> isolate 215 18S ribosom... 345 2e-93	214/226 (94%),
AF243409 AF243409.1 <i>Sphaeropsis sapinea</i> isolate 411 18S ribosom... 345 2e-93	214/226 (94%),
U28059 U28059.1 <i>Sphaceloma fawcettii</i> 18S ribosomal RNA and 26S ... 339 1e-91	189/195 (96%)
U28058 U28058.1 <i>Elsinoe fawcettii</i> 18S ribosomal RNA and 26S rib... 339 1e-91	189/195 (96%)
AF297232 AF297232.1 <i>Cercospora sorghi</i> f. <i>maydis</i> Kenya 1 18S rib... 335 2e-90	187/193 (96%)
AF297230 AF297230.1 <i>Cercospora nicotianae</i> 18S ribosomal RNA gen... 335 2e-90	187/193 (96%)
AF297229 AF297229.1 <i>Cercospora asparagi</i> 18S ribosomal RNA gene,... 335 2e-90	187/193 (96%)
AF243394 AF243394.1 <i>Botryosphaeria ribis</i> isolate 96-8 18S ribos... 335 2e-90	212/225 (94%),
AF243393 AF243393.1 <i>Botryosphaeria ribis</i> isolate 94-128 18S rib... 335 2e-90	212/225 (94%),
AF079776 AF079776.1 <i>Phomopsis amaranthicola</i> 18S ribosomal RNA g... 335 2e-90	187/193 (96%)
AB041245 AB041245.1 <i>Guignardia loricata</i> genes for 18S rRNA, ITS... 333 9e-90	189/196 (96%)
AF297667 AF297667.1 <i>Umbilicaria muehlenbergii</i> isolate smll004 1... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF297666 AF297666.1 <i>Umbilicaria muehlenbergii</i> isolate smll003 1... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF141190 AF141190.1 <i>Neofabraea alba</i> 18S ribosomal RNA gene, par... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF141189 AF141189.1 <i>Neofabraea malicorticis</i> 18S ribosomal RNA g... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF141181 AF141181.1 <i>Pezizula ocellata</i> strain CBS267.39 18S ribo... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF096204 AF096204.1 <i>Umbilicaria muehlenbergii</i> 18S ribosomal RNA... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF083199 AF083199.1 <i>Phialophora</i> sp. p3901 18S ribosomal RNA, pa... 331 4e-89	182/187 (97%)
AF383949 AF383949.1 <i>Botryosphaeria quercuum</i> 18S ribosomal RNA g... 327 6e-88	190/197 (96%),

〔表 1 1〕

Sequences producing significant alignments:		(bits) Value
AJ276062 AJ276062.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1043 0.0	526/526 (100%)
AF182377 AF182377.1 Hormonema sp. F-054,764 internal transcribe...	1011 0.0	510/510 (100%)
AF121284 AF121284.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC42457 in...	1007 0.0	508/508 (100%)
AF013229 AF013229.1 Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	1005 0.0	556/567 (98%),
AJ244269 AJ244269.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1003 0.0	506/506 (100%)
AJ244236 AJ244236.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1003 0.0	506/506 (100%)
AF121286 AF121286.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	991 0.0	506/508 (99%)
AF121285 AF121285.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC48433 in...	959 0.0	502/508 (98%)
AF121281 AF121281.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC11942 in...	959 0.0	502/508 (98%)
AJ244232 AJ244232.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	955 0.0	500/506 (98%)
AJ276061 AJ276061.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	954 0.0	502/505 (99%),
AJ244265 AJ244265.1 Trimmatostroma abietina 5.8S rRNA gene and ...	942 0.0	500/507 (98%),
AJ244233 AJ244233.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	942 0.0	493/499 (98%)
AJ244231 AJ244231.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	942 0.0	500/507 (98%),
AJ244235 AJ244235.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	932 0.0	497/506 (98%)
AJ244234 AJ244234.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	932 0.0	497/506 (98%)
AF121287 AF121287.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	924	501/510 (98%),

〔表 1 2〕

Sequences producing significant alignments:		(bits) Value
AJ276062 AJ276062.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1021 0.0	525/527 (99%),
AF013229 AF013229.1 Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	997 0.0	554/567 (97%),
AF182377 AF182377.1 Hormonema sp. F-054,764 internal transcribe...	989 0.0	509/511 (99%),
AF121284 AF121284.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC42457 in...	985 0.0	507/509 (99%),
AJ244269 AJ244269.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	981 0.0	505/507 (99%),
AJ244236 AJ244236.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	981 0.0	505/507 (99%),
AF121286 AF121286.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	969 0.0	505/509 (99%),
AJ244265 AJ244265.1 Trimmatostroma abietina 5.8S rRNA gene and ...	965 0.0	502/507 (99%),
AJ244231 AJ244231.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	965 0.0	502/507 (99%),
AJ276061 AJ276061.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	940 0.0	502/506 (99%),
AF121287 AF121287.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	940 0.0	502/510 (98%),
AF121285 AF121285.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC48433 in...	938 0.0	501/509 (98%),
AF121281 AF121281.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC11942 in...	938 0.0	501/509 (98%),
AJ244232 AJ244232.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	934 0.0	499/507 (98%),
AY029406 AY029406.1 Astasia longa internal transcribed spacer 1...	932 0.0	531/546 (97%),
AJ244235 AJ244235.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	926 0.0	498/507 (98%),
AJ244234 AJ244234.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	926 0.0	498/507 (98%),
AJ244233 AJ244233.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	920 0.0	492/500 (98%),
AJ244252 AJ244252.1 Kabatiella lini 5.8S rRNA gene and internal...	912 0.0	497/508 (97%),
AJ244251 AJ244251.1 Kabatiella caulivora 5.8S rRNA gene and int...	872 0.0	492/508 (96%),
AF013225 AF013225.1 Phaeocryptopus gaumanni 18S ribosomal RNA...	454 e-126	362/398 (90%),
AJ244257 AJ244257.1 Pringsheimia smilacis 5.8S rRNA gene and in...	436 e-121	256/264 (96%),

〔実施例 5 0〕

30 ml 容量の試験管に Y M 培地 (ディフコ社) 5.5 ml を入れ、滅菌後 (121℃、20 分間)、冷却してから、YPD 寒天培地 (ディフコ社) のスラントにて保存してある ADK-34 菌株を一白金耳、植菌し、300 rpm の振とう培養器にて 26℃ で 4 日間培養し、種培養液を得た。別の試験管にクザベック培地 (ディフコ社、シュクロース濃度 3 重量%) 5.5 ml を入れ滅菌後、ADK-34 菌株の種培養液 500 μ l を添加 (5% 植菌) し、300 rpm の振とう培養器にて 26℃ で 4 日間培養した。培養液は白色で顕著な粘性を有していた。培養後、培養液に等量の蒸留水を加え、15 分間、高圧蒸気殺菌してから、10000 rpm で 15 分間遠心分離して多糖を含有する培養上清を得た。培養上清中の β グルカン量及び多糖のプルランに対する純度を前記分析例 1 及び前記分析例 3 の測定方法によりそれぞれ測定した。その結果、多糖のプルランに対する純度は 100% であり、 β グルカン量から算出した β グルカンの対糖収率は 44% であった。なお、培養上清の 490 nm による吸光値は 0.030 であり、着色が抑制されていた。また、前記分析例 2 の測定方法により β グルカンの分子量を測定したところ、分子量は 15 万~200 万を示した。また、培養上清の凍結乾燥物をサンプル L とした。

同様の方法で IFO-6353 株を培養し、 β グルカン量及び多糖のプルランに対する純度を測定したところ、多糖のプルランに対する純度は 40%、 β グルカンの対糖収率は 11% と算出された。なお、培養上清の 490 nm による吸光値は 0.190 であり、着色が認められた。

〔実施例 5 1〕

イースト窒素源基礎培地粉末 (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate : ディフコ社) 1.7 g を 100 ml の蒸留水に溶解させ、フィルター滅菌した。硝酸ナトリウム 5 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、2 倍濃度の硝酸ナトリウム溶液を調製した。炭素源として、シュクロース、グルコース、フラクトース、可溶性デンプン又はマルトース (和光純薬工業) を用いて、12 重量% 炭素源水溶液をそれぞれ調製した。硝酸ナトリウム、炭素源水溶液及び蒸留水をオートクレーブ滅菌 (121℃、20 min.) し、滅菌済みの試験

管に、イースト窒素源基礎培地 1 ml、硝酸ナトリウム溶液 5 ml、炭素源水溶液 2.5 ml 及び蒸留水 1.5 ml 加え、全量を 10 ml とし、各炭素源を添加した炭素源チェック培地を調製した。

30 ml 容量の試験管に、YM 培地（ディフコ社）5.5 ml を入れ、滅菌後（121℃、20 分間）、冷却してから、YPD 寒天培地（ディフコ社）のスラントにて保存してある ADK-34 菌株を一白金耳、植菌し、300 rpm の振とう培養器にて 26℃ で 4 日間培養し、種培養液を得た。得られた種培養液を上記炭素源チェック培地に植菌し、300 rpm の振とう培養器にて 26℃ で 5 日間培養した。培養液は白色で顕著な粘性を有していた。培養後、培養液に等量の蒸留水を加え、15 分間、高圧蒸気殺菌してから、10000 rpm で 15 分間遠心分離して多糖を含有する培養上清を得た。培養上清中の β グルカン量及び多糖のプルランに対する純度を前記分析例 1 及び前記分析例 3 の測定方法によりそれぞれ測定した。測定結果を表 13 に示す。表 13 から明らかなように、どの炭素源においても、多糖のプルランに対する純度は 90% 以上であり、 β グルカンの対糖収率は 20～46% と算出された。なお、培養上清の 490 nm による吸光度は 0.026～0.041 であり、着色が抑制されていた。また、前記分析例 2 の測定方法により β グルカンの分子量を測定したところ、分子量は 15 万～200 万であった。

〔表 13〕

炭素源	純度 (%)	β グルカンの 対糖収率 (%)	培養液の 吸光度 (490nm)
シュクロース	100	46	0.031
グルコース	110	44	0.033
フラクトース	104	20	0.031
可溶性デンプン	96	34	0.041
マルトース	94	29	0.026

〔実施例 52〕

ADK-34 株を YM 培地に植菌し、26℃ にて 3 日間培養して、300 ml

の種培養液を得た。フルゾーン翼を搭載した5 Lジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニア社）に、クザベック培地3 L及びシュークロース300 gを入れ、滅菌・冷却後、100 mlの種培養液を植菌し、26℃にて72時間の培養を実施し、培養液3 Lを得た。培養液を80℃にて30分間加熱して、殺菌した後、等量の蒸留水を添加し、よく混合してから、8000 rpmで15分間遠心分離して、培養希釈液を得た。培養希釈液をさらに蒸留水で5倍希釈し、吸光度を測定したところ、490 nmにおいて0.023であった。培養希釈液100 mlに等量のエタノールを添加し、得られた沈殿を分離し、エタノールで洗浄し、そのまま50 mlの蒸留水に溶解させた。この操作を再度繰り返し、透析膜（分子量3000カット）に入れ10倍量の蒸留水で透析を実施した。最終的に100 mlの多糖溶液を得た。このときのβグルカン量は25 mg/ml、多糖のプルランに対する純度は95%、βグルカンの分子量は15万～200万と算出された。

〔実施例53〕（βグルカン含有油脂組成物）

前記サンプルLの100部と大豆油100部をニダーでよく混合し、60℃で10分間放置後、室温に冷却してクリーム状になった本発明のβグルカン含有油脂組成物を得た。βグルカンは油脂中に均一に分散した。

産業上の利用可能性

本発明のβグルカン含有油脂組成物は、優れた生体調節機能性を有するβグルカンが油脂中に均一に分散しており、食品等に使用することにより、上記βグルカンを食品等に均一に分散でき、かつ該食品等の食味、食感、安定性等を向上させることができる。更に、本発明の微生物を使用することにより、シュークロース等の安価な糖類から高活性で高品質のβグルカンを、効率良く高い生産速度で製造することができる。

請 求 の 範 囲

1. 微生物類由来または担子菌類由来の β グルカンを含むことを特徴とする β グルカン含有油脂組成物。
2. 上記 β グルカンが、微生物類または担子菌類を培養することによって菌体外に分泌された β グルカンである請求の範囲第1項記載の β グルカン含有油脂組成物。
3. 上記 β グルカンが、微生物類または担子菌類を培養することによって得た培養細胞である請求の範囲第1項記載の β グルカン含有油脂組成物。
4. 上記微生物類が、酵母菌、乳酸菌、クロレラ、藻類、またはアウレオバシジウム(*Aureobasidium*) 属に属する微生物である請求の範囲第1項記載の β グルカン含有油脂組成物。
5. 上記微生物類が、18S rRNA遺伝子の1732塩基の配列が、配列表の配列番号1に示す塩基配列、またはこの塩基配列と18S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、さらに抗生物質であるシクロヘキシミド(cycloheximide)に対する抵抗性を有し、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物である請求の範囲第1項記載の β グルカン含有油脂組成物。
6. 上記微生物類が、ITS-5.8S rRNA遺伝子の563塩基の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列、またはこの塩基配列とITS-5.8S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物である請求の範囲第1項記載の β グルカン含有油脂組成物。
7. β グルカン含有量が、該 β グルカン以外の全組成物100重量部に対して0.01～500重量部である請求の範囲第1項記載の β グルカン含有油脂組成物。
8. 請求の範囲第1～7項の何れかに記載の β グルカン含有油脂組成物を含有する食品。

9. 請求の範囲第1～7項の何れかに記載の β グルカン含有油脂組成物を含有するベーカリー製品。

10. 請求の範囲第1～7項の何れかに記載の β グルカン含有油脂組成物を含有する製菓類。

11. 請求の範囲第1～7項の何れかに記載の β グルカン含有油脂組成物を含有する生活習慣病予防作用を有する食品。

12. 請求の範囲第1～7項の何れかに記載の β グルカン含有油脂組成物を含有する生活習慣病予防作用を有する医薬品。

13. 請求の範囲第1～7項の何れかに記載の β グルカン含有油脂組成物を含有する米、小麦、トウモロコシ又は大豆加工品。

14. 18S rRNA遺伝子の1732塩基の配列が、配列表の配列番号1に示す塩基配列、またはこの塩基配列と18S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、さらに抗生物質であるシクロヘキシミド(cycloheximide)に対する抵抗性を有し、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物。

15. ITS-5.8S rRNA遺伝子の563塩基の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列、またはこの塩基配列とITS-5.8S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学上同等の塩基配列を含み、かつ、 β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する微生物。

16. 抗生物質であるシクロヘキシミド(cycloheximide)に対する抵抗性を有する請求の範囲第15項記載の微生物。

17. その構造に少なくとも β -1, 3-D-グルコピラノース結合を有する β グルカンを菌体外に分泌生産する能力を有する請求の範囲第14～16項の何れかに記載の微生物。

18. アウレオバシジウム(Aureobasidium)属に属する請求の範囲第14～16項の何れかに記載の微生物。

19. アウレオバシジウム プルランス(Aureobasidium pullulans)ADK-34(FERM BP-8391)菌株である請求の範囲第14～16項の何れかに記載の微生物。

20. 請求の範囲第14～16項の何れかに記載の微生物を培養し、 β グルカンを菌体外に分泌生産させることを特徴とする β グルカンの製造方法。

21. ITS-5.8S rRNA遺伝子の配列が、配列表の配列番号2に示す塩基配列と98%以上の相同性を示す微生物を培養し、 β グルカンを菌体外に分泌生産させることを特徴とする β グルカンの製造方法。

22. 微生物の培養を、炭素源として糖類を含有する培養液を用いて行なう請求の範囲第20項または第21項記載の β グルカンの製造方法。

23. アウレオバシジウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) ADK-34 (FERM BP-8391) 菌株を培養することによって菌体外に分泌生産され、その構造に少なくとも β -1, 3-D-グルコピラノース結合を有する β グルカン。

SEQUENCE LISTING

<110> ASAHI DENKA Co., Ltd.

<120> New microorganism and method for producing β glucan by the new microorganism

<130> A0301

<160> 4

<210> 1

<211> 1732

<212> DNA

<213> Aureobasidium pullulans ADK-34

<400> 1

```

aaagattaag ccatgcatgt ctaagtataa gcaactatac ggtgaaactg cgaatggctc   60
attaaatcag ttatcgttta ttgatagta ccttactact tggataaccg tggtaatctt   120
agagctaata catgctaaaa accccaactt cggaaggggt gtatttatta gataaaaaac   180
caacgccctt cggggctcct tggtgattca taataactaa acgaatcgca tggccttgcg   240
cgggcgatgg ttcatctaaa tttctgcctt atcaactttc gatggtagga tagtggccta   300
ccatggtatc aacgggtaac ggggaattag ggttctatcc cggagaggga gcctgagaaa   360
cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatta cccaatcccg acacggggag   420
gtagtgacaa taaatactga tacagggttc ttttgggtct tgtaattgga atgagtacaa   480
tttaaattcc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat   540
tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa aagctcgtag ttgaaccttg   600
ggcctggctg gccggtccgc ctcaccgcgt gtactggtcc ggccgggcct ttccttcttg   660
ggagccgcat gcccttcaact gggcgtgtcg gggaaccagg acttttactt tgaaaaaatt   720
agagtgttca aagcaggcct ttgctcgaat acattagcat ggaataatag aataggacgt   780
gcggttctat tttgttggtt tctaggaccg ccgtaatgat taatagggat agtcgggggc   840
atcagtattc aattgtcaga ggtgaaattc ttggatttat tgaagactaa ctactgcgaa   900
agcatttgcc aaggatgttt tcattaatca gtgaacgaaa gttaggggat cgaagacgat   960

```

cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta gggatcgggc gatgttatca 1020
 ttttgactcg ctccggcacct tacgagaaat caaagtcttt gggttctggg gggagtatgg 1080
 tcgcaaggct gaaacttaaa gaaattgacg gaagggcacc accaggcgtg gagcctgcgg 1140
 cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac cagggtccaga cacaataagg attgacagat 1200
 tgagagctct ttcttgattt tgtgggtggt ggtgcatggc cgttcttagt tgggtggagt 1260
 atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc tgctaaatag cccggcccg 1320
 tttggcgggt cgccggcttc ttagaggagc tatcggctca agccgatgga agtttgaggc 1380
 aataacaggc ctgtgatgcc cttagatggt ctgggcccga cgcgcgctac actgacagag 1440
 ccaacgagtt catttccttg cccggaaggg ttgggtaatc ttgttaaact ctgtcgtgct 1500
 ggggatagag cattgcaatt attgctcttc aacgaggaat gcctagtaag cgtacgtcat 1560
 cagcgtgcgt tgattacgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgtcgcta ctaccgattg 1620
 aatggctgag tgaggccttc ggactggccc agggaggtcg gcaacgacca cccagggccg 1680
 gaaagttggt caaactccgt catttagagg aagtaaaagt cgtaacaagg tt 1732

<210> 2

<211> 563

<212> DNA

<213> Aureobasidium pullulans ADK-34

<400> 2

tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taaagagtaa ggggtgctcag cgcccgacct 60
 ccaacccttt gttgttaaaa ctaccttgtt gctttggcgg gaccgctcgg ttccgagccg 120
 ctggggattc gtcccaggcg agtgcccgcc agagttaaac caaactcttg ttattaaacc 180
 ggtcgtctga gttaaaattt tgaataaate aaaactttca acaacggatc tcttggttct 240
 cgcacgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga 300
 tcatcgaatc ttgtaacgca cattgcgccc cttggtattc cgaggggcat gcctgttcga 360
 gcgtcattac accactcaag ctatgcttgg tattgggtgc cgtccttagt tgggcgcgcc 420
 ttaaagacct cggcgaggcc actccggctt taggcgtagt agaatttatt cgaacgtctg 480
 tcaaaggaga ggaactctgc cgattgaaac ctttatTTTT ctaggttgac ctcggatcag 540
 gtagggatac ccgctgaact taa 563

<210> 3

<211> 563

<212> DNA

<213> Aureobasidium pullulans IFO-6353

<400> 3

```

tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taaagagtaa gggtagctcag cgcccgcacct 60
ccaacccttt gttgttaaaa ctaccttggt gctttggcgg gaccgctcgg tctcgagccg 120
ctggggattc gtcccaggcg agcgcccgcc agagttaaac caaactcttg ttatttaacc 180
ggtcgtctga gttaaaatth tgaataaatc aaaactttca acaacggatc tcttggttct 240
cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga 300
tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc cttggtattc cgaggggcat gcctgttcga 360
gcgtcattac accactcaag ctatgcttgg tattgggtgc cgtccttagt tgggcgcgcc 420
ttaaagacct cggcgaggcc tcaccggctt taggcgtagt agaatttatt cgaacgtctg 480
tcaaaggaga ggacttctgc cgactgaaac ctttattttt ctaggttgac ctcggatcag 540
gtagggatac ccgctgaact taa 563

```

<210> 4

<211> 564

<212> DNA

<213> Aureobasidium pullulans IFO-7757

<400> 4

```

tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taaagagtaa gggtagctcag cgcccgcacct 60
ccaacccttt gttgttaaaa ctaccttggt gctttggcgg gaccgctcgg tctcgagccg 120
ctggggattc gtcccaggcg agcgcccgcc agagttaaac caaactcttg ttatttaacc 180
ggtcgtctga gttaaaatth tgaataaatc aaaactttca acaacggatc tcttggttct 240
cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga 300
tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc cttggtattc cgaggggcat gcctgttcga 360
gcgtcattac accactcaag ctatgcttgg tattgggtgc cgtccttagt tgggcgcgcc 420
ttaaagacct cggcgaggcc tcaccggctt taggcgtagt agaatttatt cgaacgtctg 480

```


tcaaaggaga ggacttctgc cgactgaaac cttttatattt tctaggttga cctcggatca 540

ggtaggata cccgctgaac ttaa 564

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P19/04, C12N1/16, A23D9/00, A23L1/30, 1/20, 1/10,
A21D2/08, A23G3/00, A61K31/716, A61P3/06, 3/10, 43/00//
(C12N1/16, C12R1:645), C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C1212P19/04, C12N1/16, A23D9/00, A23L1/30, 1/20, 1/10,
A21D2/08, A23G3/00, A61K31/716, A61P3/06, 3/10, 43/00//
(C12N1/16, C12R1:645), C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed,
EMBL/Genbank/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 6-340701 A (Nippon Oil Co., Ltd.), 13 December, 1994 (13.12.94), (Family: none)	1-13, 23/ 14-22
X/A	JP 7-51080 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 28 February, 1995 (28.02.95), (Family: none)	1-13, 23/ 14-22
X/A	JP 3-229702 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 11 October, 1991 (11.10.91), (Family: none)	1-13, 23/ 14-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 July, 2003 (16.07.03)

Date of mailing of the international search report
29 July, 2003 (29.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07739

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	EP 236124 A2 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 09 September, 1987 (09.09.87), & JP 62-201901 A & US 4965347 A & CA 1335579 A	1-13, 23/ 14-22
X/A	EP 222302 A2 (Consortium für elektrochemische Industrie GmbH), 20 May, 1987 (20.05.87), & JP 62-111681 A & US 5019514 A & DE 3539180 A1 & CA 1313156 A & AT 76661 T	1-13, 23/ 14-22
A	JP 2001-245657 A (Takehara Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 11 September, 2001 (11.09.01), (Family: none)	14
A	JP 2001-247566 A (Kabushiki Kaisha Biotechnology Kenkyusho), 11 September, 2001 (11.09.01), (Family: none)	14
A	EP 859061 A2 (Novartis AG.), 19 August, 1998 (19.08.98), & US 5800997 A & US 6071698 A & CA 2214864 A	15
A	Navarini L. et al., Structural characterization and solution properties of an acidic branched (1 → 3)-β-D-glucan from Aureobasidium pullulans. International Journal of Biological Macromolecules October 1997, Vol.19, No.3, pages 157 to 163	1-23
P,X P,A	JP 2002-241784 A (Asahi Denka Kogyo Kabushiki Kaisha), 28 August, 2002 (28.08.02), (Family: none)	1-13, 23 14-22
P,X P,A	JP 2002-306064 A (Asahi Denka Kogyo Kabushiki Kaisha), 22 October, 2002 (22.10.22), (Family: none)	1-13, 23 14-22
P,X P,A	JP 2003-159011 A (Yasufumi ONAKA), 03 June, 2003 (03.06.03), (Family: none)	1-13, 23 14-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/04, C12N1/16, A23D9/00, A23L1/30, 1/20, 1/10, A21D2/08, A23G3/00, A61K31/716, A61P3/06, 3/10, 43/00 // (C12N1/16, C12R1:645), C08B37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/04, C12N1/16, A23D9/00, A23L1/30, 1/20, 1/10, A21D2/08, A23G3/00, A61K31/716, A61P3/06, 3/10, 43/00 // (C12N1/16, C12R1:645), C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed
EMBL/Genbank/DBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 6-340701 A (日本石油株式会社) 1994.12.13 (ファミリーなし)	1-13, 23/14-22
X/A	JP 7-51080 A (日本合成化学工業株式会社) 1995.02.28 (ファミリーなし)	1-13, 23/14-22
X/A	JP 3-229702 A (雪印乳業株式会社) 1991.10.11 (ファミリーなし)	1-13, 23/14-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.07.03

国際調査報告の発送日

29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	EP 236124 A2 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo) 1987.09.09 & JP 62-201901 A & US 4965347 A & CA 1335579 A	1-13, 23/14-22
X/A	EP 222302 A2 (Consortium für elektrochemische Industrie GmbH) 1987.05.20 & JP 62-111681 A & US 5019514 A & DE 3539180 A1 & CA 1313156 A & AT 76661 T	1-13, 23/14-22
A	JP 2001-245657 A (竹原化学工業株式会社) 2001.09.11 (ファミリーなし)	14
A	JP 2001-247566 A (株式会社バイオテクノロジー研究所) 2001.09.11 (ファミリーなし)	14
A	EP 859061 A2 (Novartis AG) 1998.08.19 & US 5800997 A & US 6071698 A & CA 2214864 A	15
A	Navarini L., et al. Structural characterization and solution properties of an acidic branched (1 → 3)-β-D-glucan from <i>Aureobasidium pullulans</i> . International Journal of Biological Macromolecules October 1997, Vol.19, No.3, p.157-163	1-23
PX/PA	JP 2002-241784 A (旭電化工業株式会社) 2002.08.28 (ファミリーなし)	1-13, 23/14-22
PX/PA	JP 2002-306064 A (旭電化工業株式会社) 2002.10.22 (ファミリーなし)	1-13, 23/14-22
PX/PA	JP 2003-159011 A (尾仲康史) 2003.06.03 (ファミリーなし)	1-13, 23/14-22